

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTA DE MEDICINA

E. A. P. DE NUTRICIÓN

**“EFECTO NEUROPROTECTOR DE LA
SEMILLA DE PRUNUS DULCIS
“ALMENDRA” SOBRE EL TEJIDO
NERVIOSO EN RATONES INDUCIDOS A
ESTRÉS POR DESORIENTACIÓN MOTORA”**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Licenciada en Nutrición

AUTOR

Jennifer Estefanía Dávila Córdova

ASESOR

Oscar Gustavo Huamán Gutiérrez

Lima – Perú

2015

DEDICATORIA

A Dios por guiar mis pasos, y poner ángeles en mi camino, que permitieron y motivaron el lograr esta meta, la tesis.

A mis padres, Luzmila y Homero, por darme la vida y todo, y por siempre animarme a seguir adelante.

A mi familia, que en las buenas y malas siempre están ahí, siendo un motivo por el cual seguir luchando.

A mis sobrinos, que son la luz y alegría en mi vida, el motivo de mis sonrisas y esfuerzo constante.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor el Mg. Oscar Huamán Gutiérrez por su exigencia para siempre dar lo mejor, por su gran apoyo, paciencia y confianza.

Al Centro de Investigación y Bioquímica, por permitirme ejecutar la tesis, y ser el lugar donde se llevó a cabo grandes vivencias y aprendizajes.

Al Instituto de Patología de la UNMSM, Dr. José Ernesto Raez Gonzales por su sabiduría y por si siempre estar presto para la lectura de las láminas histológicas, y por su gran carisma.

A la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, a la Escuela Profesional de Nutrición, por ser mi alma mater, y la cuna de conocimientos, vivencias y experiencias inolvidables.

A los miembros del jurado de sustentación de tesis por dar su tiempo desde la etapa de observación y que culminó con la aprobación de la tesis.

A los profesores por sus enseñanzas, no solo de teoría sino para la vida.

A los amigos que conocí y con los que compartí grandes experiencias, por permitirme crecer con su amistad.

TABLA DE CONTENIDO

I. INTRODUCCIÓN	1
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	9
2.1 Hipótesis	9
2.2 Objetivos	9
III. MATERIALES Y MÉTODOS	10
3.1 Tipo de estudio.....	10
3.2 Materiales.....	10
3.3 Muestreo	11
3.4 Variables	11
3.5 Método experimental	12
3.6 Determinación de los marcadores bioquímicos	16
3.7 Análisis de datos	20
3.8 Consideraciones éticas	20
IV. RESULTADOS.....	21
V. DISCUSIÓN.....	31
VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	39
6.1 Conclusiones.....	39
6.2 Recomendaciones.....	39
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
ANEXOS	46

ÍNDICE DE CUADROS Y TABLAS

Definición operacional de variables.....	12
Tabla 1: Distribución de ratones según grupos de tratamiento.....	14
Tabla 2: Lipoperoxidación en homogenizado de cerebro según grupo de tratamiento.....	22
Tabla 3: Grupos sulfhídricos no proteicos (GS-NP) en homogenizado de cerebro de ratones según grupo de tratamiento.....	23

INDICE DE FIGURAS

Flujograma: Diseño experimental.....	15
Figura 1: Reacción de TBA con 2 MDA.....	16
Figura 2: Microfotografía de la corteza cerebral del grupo I (con bigotes/sin tratamiento).....	24
Figura 3: Microfotografía del hipocampo (zona límbica) del grupo I (con bigotes/sin tratamiento).....	24
Figura 4: Microfotografía del cerebelo del grupo I (con bigotes/sin tratamiento).....	24
Figura 5: Microfotografía de la corteza cerebral del grupo II (sin bigotes/sin tratamiento).....	25
Figura 6: Microfotografía del hipocampo (zona límbica) del grupo II (sin bigotes/sin tratamiento).....	25
Figura 7: Microfotografía del cerebelo del grupo II (sin bigotes/sin tratamiento).....	25
Figura 8: Microfotografía de la corteza cerebral del grupo III (vitamina E/sin bigotes)...	26
Figura 9: Microfotografía del hipocampo (zona límbica) del grupo II (sin bigotes/sin tratamiento).....	26
Figura 10: Microfotografía del cerebelo del grupo II (sin bigotes/sin tratamiento).....	27
Figura 11: Microfotografía de la corteza cerebral del grupo IV (almendra 100 mg/kg /sin bigotes).....	28
Figura 12: Microfotografía del hipocampo (zona límbica) del grupo IV (almendra 100 mg/kg /sin bigotes).....	28
Figura 13: Microfotografía del cerebelo del grupo IV (almendra 100 mg/kg /sin bigotes).....	28
Figura 14: Microfotografía de la corteza cerebral del grupo V (almendra 500 mg/kg /sin bigotes).....	29
Figura 15: Microfotografía del hipocampo (zona límbica) del grupo V (almendra 500 mg/kg /sin bigotes).....	29
Figura 16: Microfotografía del cerebelo del grupo V (almendra 500 mg/kg /sin bigotes).....	29
Figura 17: Microfotografía de la corteza cerebral del grupo VI (almendra 1000 mg/kg /sin bigotes).....	30
Figura 18: Microfotografía del hipocampo (zona límbica) del grupo VI (almendra 1000 mg/kg /sin bigotes).....	30
Figura 19: Microfotografía del cerebelo del grupo VI.....	31

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1.....	46
---------------------	-----------

Esquema: Estrés oxidativo inducido por estrés psicológico

Anexo 2	47
----------------------	-----------

Valor nutricional de la almendra

Anexo 3.....	49
---------------------	-----------

Aporte de flavonoides en 100 gramos de *Prunis dulcis* “almendra”

Anexo 4.....	50
---------------------	-----------

Taxonomía de la almendra

RESUMEN

Objetivo: Determinar el efecto neuroprotector de la administración de la semilla de *Prunus dulcis* “almendra” sobre el tejido nervioso en ratones inducidos a estrés por desorientación motora. **Diseño:** Estudio analítico, transversal, experimental y prospectivo. **Lugar:** Laboratorios del Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición Alberto Guzmán Barrón, Facultad de Medicina, UNMSM, Lima, Perú. **Materiales:** Ratones albinos BALB/c (*Mus musculus*) machos y *Prunus dulcis* “almendra”. **Métodos:** Se utilizó 42 ratones, según expertos, de 3 meses de edad y $31 \pm 4,4$ g de peso, distribuidos aleatoriamente en seis grupos (n=7). Todos los grupos recibieron la misma dieta balanceada y agua *ad libitum* durante 5 días. Recibieron los siguientes tratamientos, por cinco días, vía peroral: grupo I y II: suero fisiológico (NaCl 0,9g% 10mL/kg), grupo III: vitamina E 400mg/kg, grupo IV: almendra 100 mg/kg, grupo V: almendra 500 mg/kg y grupo VI: almendra 1000 mg/kg; 12 horas antes de finalizar el Tto. se cortaron los bigotes de los ratones, excepto al grupo I; y luego de 12 horas se realizó el sacrificio. **Principales medidas de los resultados:** Nivel de lipoperoxidación expresado en sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARs) y nivel de Grupos sulfhídricos no proteicos (GS-NP), además de cambios histopatológicos de tejido de cerebro y cerebelo. **Resultados:** La administración de *Prunus dulcis* “almendra” aumenta significativamente ($p<0.05$) los niveles de GS-NP en todos los grupos (excepto G VI) en comparación con el G II en cerebro; los niveles de TBARs disminuyen significativamente ($p<0.05$) en el grupo V y VI comparado con el grupo II, y en relación a los cambios histológicos se observa una mejora leve en el G V en comparación con el GII. **Conclusiones:** La administración de la suspensión de la semilla del *Prunus dulcis* “almendra” expuso un efecto neuroprotector en los indicadores bioquímicos (TBARs y GS-NP), sobre el tejido nervioso en ratones inducidos a estrés por desorientación motora.

PALABRAS CLAVES: *Prunus dulcis* “almendra”, Grupos sulfhídricos no proteicos (GS-NP), Lipoperoxidación (TBARs), cambio histopatológico, estrés por desorientación motora.

ABSTRACT

Objetive: Determine the neuroprotective effect of administration of *Prunus dulcis* seed "almond" on the nervous tissue in motor stress induced disorientation mice. **Design:** Analytical, transverse, experimental and prospective study. **Location:** Laboratories of the Research Center of Biochemistry and Nutrition Alberto Guzman Barron, Faculty of Medicine, UNMSM, Lima, Peru. **Materials:** Mice albino BALB / c (*Mus musculus*) males and *Prunus dulcis* "almond". **Methods:** 42 mice was used, experts say, 3 months and $31 \pm 4,4$ g in weight, randomized into six groups ($n = 7$). All groups received the same balanced diet and water ad libitum for 5 days. They received the following treatments for five days, perorally: group I and II: saline (NaCl 0.9g% 10 mL / kg), group III: Vitamin E 400 mg / kg, group IV: almond 100 mg / kg, group V : almond 500 mg / kg and group VI: almond 1000 mg / kg; 12 hours before the end of Tto. Cut whiskers of mice, except the group I; and after 12 hours they were sacrificed. **Main outcome measures:** Level of lipid peroxidation expressed in thiobarbituric acid (TBARS) and level of non-protein sulfhydryl groups (GS-NP) substances in addition to histopathological changes of brain tissue and cerebellum. **Results:** Administration of *Prunus dulcis* "almond" significantly increased ($p < 0.05$) levels of GS-NP in all groups (except G VI) compared to the G II in brain; TBARS levels decreased significantly ($p < 0.05$) in the V and VI group compared with group II, and in relation to the histological changes seen a slight improvement in the GV compared to GII. **Conclusions:** The administration of the suspension of *Prunus dulcis* seed "almond" demonstrated the neuroprotective effect in biochemical (TBARS y GS-NP) on the nervous tissue in mice induced to stress motor disorientation.

KEYWORDS: *Prunus dulcis* "almond" non-protein sulfhydryl groups (GS-NP), lipid peroxidation (TBARS), histopathological changes, disorientation motor stress.

I. INTRODUCCIÓN

En el Perú, 1,2 millones de habitantes sufren de algún trastorno de ansiedad, provocado por un fuerte cuadro de estrés. De acuerdo con los últimos reportes del Ministerio de Salud del Perú (MINSA), esta cifra equivale al 5,9% de los adultos, mayores de 18 años, que padecen de algún nivel de angustia por estrés (1). En la actualidad, el estrés es considerado un factor predisponente, desencadenante o coadyuvante de múltiples enfermedades como: la obesidad, diabetes de tipo 2, enfermedades cardíacas, digestivas y neurodegenerativas como Alzheimer y Parkinson (2); cuyas cifras van en aumento progresivo, causando en el mundo la muerte a más de 38 millones de personas cada año, según la OMS (3). Además, estas últimas enfermedades están relacionadas con el aumento de la esperanza de vida y la disminución de la tasa de natalidad, y se prevé que en el Perú la población de 60 años a más crecerá del 7,4 al 12% para el año 2025 (4,5), convirtiéndose en una preocupación social tanto en términos de calidad de vida y aumento de la carga económica (6).

Como parte de la vida, el ser humano busca adaptarse continuamente al cambio que ocurre en su entorno, busca lograr un equilibrio entre su organismo y el medio ambiente; sin embargo, hoy en día la era tecnológica ha vuelto más compleja la vida de la población, produciendo estrés, y el organismo en respuesta desencadena cambios en su funcionamiento normal, relacionados principalmente con el sistema nervioso central y sistema inmune, siendo estos cambios un factor causal del proceso de estrés oxidativo, debido a un exceso en la producción de radicales libres como resultado del metabolismo aeróbico, que generan daño oxidativo (7,8), además el estrés afecta negativamente la salud mental y física, y contribuye a acelerar el envejecimiento (2).

El cerebro posee un elevado metabolismo oxidativo y un alto contenido de moléculas susceptibles a ser dañadas por especies reactivas (12), por ello, es el principal órgano diana que se ve afectado en el estado de estrés no controlado, y que está relacionado con las hormonas de estrés y estrés oxidativo (13). Los efectos del estrés en el cerebro se inician con la activación del eje Hipotalámico-Hipofisario-Adrenal (HPA), en el hipotálamo se

incrementará la síntesis y liberación de la hormona liberadora de hormona adrenocorticotropa (CRF), que estimulará en la hipófisis la liberación de hormona adrenocorticotropa (ACTH), que a su vez conducirá a secretar hormonas tales como: cortisol (clase de los glucocorticoides) y catecolaminas (adrenalina, nor-adrenalina y dopamina) (14).

La alta concentración de las hormonas de estrés, especialmente cortisol, no sólo conduce a dañar las células del cerebro (hipocampo, amígdala y la corteza cerebral), sino también acelerar los trastornos neurodegenerativos del cerebro (15). El alto nivel de cortisol además aumenta el tono excitatorio, disminuye los factores de crecimiento, y provoca la liberación de citoquinas proinflamatorias (IL-1, IL-6 y TNF α), estas citoquinas aumentan la producción de radicales libres (principalmente hidroxilo) que conlleva a la presencia de estrés oxidativo, que produce en la célula efectos tóxicos por oxidación de biomoléculas como lípidos, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos (16). Por lo tanto, el exceso de secreción de cortisol, como un producto final de la respuesta al estrés, también conducirá a la disminución de la neurogénesis (principalmente en el hipocampo), lo que llevaría a la formación de placas seniles, atrofia, disfunción mitocondrial, toxicidad de calcio, excitotoxicidad y apoptosis (15,17) (Anexo 1).

En comparación con otros órganos, el cerebro presenta unas características propias de su metabolismo, que lo hacen especialmente susceptible al daño oxidativo (18). Esta vulnerabilidad se debe a:

- Elevado consumo de oxígeno por el cerebro. El cerebro representa solo el 2% del peso corporal total, pero la alta cantidad de ATP demandada por las neuronas para el mantenimiento del potencial de membrana y la liberación y almacenamiento de los neurotransmisores, hacen que el cerebro requiera un elevado y constante aporte de oxígeno, que supone una quinta parte del oxígeno corporal total (20%) (18).

- Composición de ácidos grasos insaturados. El 80% de los lípidos que constituyen el cerebro son ácidos grasos insaturados, principalmente del tipo 20:4 (ácido araquidónico) y 22:6 (ácido docosahexaenoico-DHA). La autopropagación del proceso de oxidación de ácidos grasos (lipoperoxidación)

conduce a la formación de productos secundarios como acroleína, malondialdehído (MDA) y F2 isoprostanos (18).

- El cerebro contiene sólo bajos a moderados niveles de actividad de las enzimas antioxidantes, como superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx), en comparación con otros órganos (18,19).

- Moléculas autooxidables. Algunos neurotransmisores como dopamina, L-DOPA (su precursor), serotonina o norepinefrina pueden generar por procesos de autooxidación diferentes especies reactivas como anión superóxido (O_2^-), los radicales hidroxilo ($\bullet OH$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (18).

- El contenido de hierro del cerebro es elevado, especialmente en determinadas áreas incluidas la sustancia negra, el núcleo caudado, el putamen y el globus pallidus. El promedio de hierro no-hemo en el cerebro es de aproximadamente 60 mg, alcanzándose el máximo nivel a los 30 años. Este hierro libre puede catalizar muchas de las reacciones que generan especies reactivas al oxígeno (ROS) como la reacción de Fenton, los procesos de autooxidación de los neurotransmisores y la lipoperoxidación (48).

- Metabolismo de la dopamina. Las isoenzimas monoaminooxidasa A (MAO-A) y monoaminooxidasa B (MAO-B) catalizan la oxidación de dopamina, generándose H_2O_2 como producto (18).

- Producción de ROS por células del sistema nervioso central (SNC). Las células de la microglía, consideradas como los macrófagos del SNC, por su capacidad para eliminar las sustancias de desecho y estructuras dañadas, cuando se encuentran activadas, liberan ROS como O_2^- y H_2O_2 así como toda una serie de citoquinas, estas últimas pueden inducir a la microglía para que libere más ROS, o bien producir la expresión de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), que produce especies reactivas derivadas de nitrógeno (ej. Óxido nítrico) (18).

Teniendo en cuenta que el cerebro es un órgano rico en lípidos, principalmente ácidos grasos insaturados, en condiciones de estrés oxidativo, estos ácidos pueden sufrir peroxidación lipídica al formar complejos de especies reactivas

de aldehído que son citotóxicos a través su capacidad para reaccionar con las proteínas, el ADN y los lípidos; por ello, un parámetro importante de ser medido es la lipoperoxidación expresada como especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARs), que puede ser indicativo de daño oxidativo en células y tejido cerebral (11,20).

La formación de lipoperoxidación puede causar disfunción celular y en células posmitóticas como las neuronas, la muerte. La oxidación causa alteraciones en la estructura de algunas proteínas y la formación de agregados proteicos, estas proteínas anormales inducen daño oxidativo y están presentes en las enfermedades neurodegenerativas (21).

La protección a nivel cerebral puede ser evaluada por diversos metabolitos, por medio de la medición de los niveles de grupos sulfhídricos no proteicos en tejido cerebral, siendo el glutatión (GSH) el componente mayoritario (95-98%) de este grupo sulfhídrico, cuya disminución pondría en evidencia la baja protección antioxidante en el tejido cerebral, como consecuencia del estrés oxidativo (15).

El tripéptido glutatión (GSH, γ -L-glutamyl-L cisteinilglycine), es sintetizado en el citoplasma y es el compuesto tiol que tiene la concentración más alta en las células de todos los órganos, funciona como antioxidante, neuromodulador y en la prevención de los daños causados por el estrés oxidativo en el cerebro, ya que mantiene en estado reducido los grupos tiol de las proteínas (22), siendo un componente importante en el sistema de defensa celular contra el estrés oxidativo. Un alto nivel de GSH intracelular protege contra una variedad de factores de estrés oxidativo, como radicales, H_2O_2 u óxido nítrico (NO) (23). En una célula sana, el glutatión normalmente existe en la forma reducida (GSH), pero GSH se convierte en su forma oxidada (GSSG) cuando las células se exponen a un mayor nivel de estrés oxidativo (24).

Varios modelos animales para el estrés y los fenómenos relacionados con él se han desarrollado, y se utilizan con frecuencia para evaluar el efecto protector de los productos naturales y compuestos sintéticos. Un modelo animal óptimo para el estrés debe tener las características de una respuesta de estrés y debe ser capaz de imitar la progresión natural de este. Existen numerosas maneras

de inducir el estrés oxidativo en tejido cerebral en animales de experimentación, entre ellos: inmovilización, choque eléctrico, quema de choque y exposición al frío, que han sido desarrollados y causan daño en las proteínas, lípidos, ADN del tejido cerebral. Sin embargo, casi todos ellos están acompañados de abuso físico, además de factores estresantes (11,25).

En el presente estudio se utilizó el modelo de estrés por desorientación motora, según el cual el simple corte de bigotes de ratones ocasiona estrés psicológico o emocional que conduce al estrés oxidativo en los tejidos. Los bigotes juegan un papel crítico como sensor de la locomoción en ratones, y por lo tanto, la entrada de los estímulos sensoriales está conectada directamente a las neuronas motoras que controlan su actividad locomotora (25,26). Por lo tanto, la eliminación de los bigotes puede afectar su comportamiento motor causando ansiedad e hiperlocomoción. Así pues, este modelo imita un estrés emocional o psicológico (11,25).

El estilo de vida actual afecta en gran medida la progresión del deterioro cognitivo, con hábitos nocivos como una dieta poco saludable, el sedentarismo, el tabaquismo, estrés y otros factores ambientales, que conducen a un mayor estrés oxidativo e inflamación. Por ello, se necesitan medidas para prevenir y reducir el riesgo de desarrollar las enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo (9), aunque en la actualidad las estrategias de prevención han sido poco desarrolladas y/o deficientes; esta prevención podría lograrse con el consumo de una dieta balanceada, rica en antioxidantes, como las vitaminas (E y C) y los flavonoides (polifenoles, antocianinas, taninos, entre otros), que sería una de las estrategias más eficaces y menos costosas (10). Además, varias de las ventajas comparativas de la utilización de alimentos para prevenir el estrés oxidativo son las siguientes: i) poco o nada tóxicos; ii) la mezcla inusual de múltiples antioxidantes en el alimento; iii) la capacidad para reaccionar a la mayoría o todos los tipos de ROS; y iv) la fácil accesibilidad (11).

Los estudios de la última década han dado a conocer el importante valor nutricional de *Prunus dulcis* "almendra", destacando su cantidad de antioxidantes, entre ellos la vitamina E (α -tocoferol), ricas en ácidos grasos

monoinsaturados (MUFA) y poliinsaturados (PUFA), altos niveles de fibra, compuestos polifenólicos, etc. (27). Los compuestos polifenólicos en las almendras se absorben fácilmente, y conjuntamente con la vitamina E funcionan para reducir los niveles de oxidación (28).

En el estudio realizado por USDA “National Nutrient Database for Standard Reference” sobre la composición nutricional de *Prunus dulcis* “almendra”, al comparar onza por onza (30 g), las almendras son el fruto seco que contiene cantidades más altas de seis nutrientes esenciales: proteínas (6 g), fibra (4 g), calcio (75 mg), vitamina E (7,4 mg), riboflavina (0,3 mg) y niacina (1 mg). El contenido de grasa predominante es la insaturada, teniendo 12,44 gramos (92%), y casi el 70% de la grasa que tienen es monoinsaturada (MUFA), siendo el ácido oleico el más importante, y también contiene el 25,8% de grasa poliinsaturada (PUFA), destacando el ácido linoleico (omega 6) (29,30).

Además, las almendras son una excelente fuente de alfa-tocoferol (35% del valor calórico total-VCT), el cual es un poderoso antioxidante que neutraliza los radicales libres. Sólo una onza de almendras son una excelente fuente de magnesio y potasio (6% VCT), fósforo (15% VCT), y hierro (6% VCT) (30,31) (Anexo 2). El contenido de fitoesteroles es de 187 mg/100 g, estas concentraciones son comparables a las encontradas en el chocolate y la linaza en 168 y 210 mg/100 g respectivamente (32). En el estudio realizado por Phillips y col. (2005) se encontró que las almendras tienen un total de fenoles de 2,4 mg GAE/g (equivalentes de ácido gálico) (27,33).

En otro estudio realizado por USDA se evaluó la capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC en inglés) que es una prueba científica para medir el potencial antioxidante total de varios alimentos y los valores se indican en equivalentes de Trolox (ET) por 100 gramos. La almendra tiene 3 742 umol ET/100g de peso fresco (4to lugar) después del durazno, ciruela y moras; y 238 mg GAE/100g de peso fresco de polifenoles (34). Además contiene flavonoides entre ellos: antocianinas, flavan-3-oles, flavanones, flavanoles y proantocianinas (30) (Anexo 3).

Evidencias epidemiológicas sugieren que una dieta rica en nueces (*Juglans*

regia) se asocia con una menor incidencia de enfermedades neurodegenerativas, ya que las nueces contienen ácidos grasos poliinsaturados, vitamina E (alfa tocoferol) y polifenoles, especialmente ácido elágico. Según Musthafa y col. (2012), el extracto de nuez disminuye la generación de radicales libres, el daño en la membrana y en el ADN, este efecto favorable se debe principalmente al contenido de polifenoles (35).

Los compuestos polifenólicos encontrados en las nueces, según el estudio realizado por Poulouse y col. (2014), no sólo reducen la oxidación y la inflamación en las células cerebrales, sino también mejoran la señalización interneuronal, aumentan la neurogénesis, y mejoran el secuestro de agregados proteicos insolubles tóxicos. Las nueces inglesas (*Juglans regia* L.) son ricas en numerosos fitoquímicos, incluyendo altas cantidades de ácidos grasos poliinsaturados, y ofrecen beneficios potenciales para la salud del cerebro (10).

Según Pribis y col. (2014), el consumo regular de frutos secos, el consumo de bayas, o ambos podría posiblemente ser utilizado como una estrategia terapéutica adyuvante en el tratamiento y prevención de varias enfermedades neurodegenerativas y disfunción cerebral relacionada con la edad. Los frutos secos son alimentos ricos en energía, particularmente ricos en grasas (MUFA y PUFA). También contienen una gran cantidad de proteína vegetal (fuente de triptófano, arginina, lisina), vitaminas (ácido fólico, riboflavina, y α , β , γ y δ tocoferoles), minerales (calcio, fósforo, magnesio, potasio, y de sodio), elementos traza (zinc, cobre y selenio), fibra soluble (rafinosa y estaquiosa), y otros compuestos potencialmente neuroprotectores como la melatonina y numerosos polifenoles (36).

Según su etimología, *Prunus*, nombre latino del ciruelo silvestris y *dulcis*, del latín dulce, por el fruto del árbol de almendro que es comestible. El almendro es una especie de la familia *Rosaceae*, cuyo nombre común es Almendro, género *Prunus* y especie *Prunus dulcis* (37). La semilla (parte comestible del almendro) es alargada, recubierta de una piel marrón y fibrosa. Es relativamente crujiente, de sabor muy suave, nada ácida, oleosa, y poco aromática cuando está cruda (29).

El fruto de *Prunus dulcis*, la almendra, es un alimento básico que se remonta a tiempos históricos, incluyendo los bíblicos. Es un fruto que procede del oeste de Asia. Fue muy difundido por toda la cuenca del mediterráneo por los fenicios y expandido por los romanos, ellos se referían a las almendras como "nuez griega", ya que en la civilización griega fueron cultivados, y luego continuo divulgándose su presencia en Europa y el Mediterráneo (37). Posteriormente, los jesuitas españoles la llevaron a California, donde se encuentra el mayor centro de producción mundial (29).

En la planta donde se procesan las almendras solo se utiliza la variedad *dulcis*, por lo que el riesgo de toxicidad es mínimo, aunque en algunos casos si alguna de las almendras no llega a la madurez se podría causar toxicidad, pero afortunadamente previo análisis organoléptico, es prácticamente imposible confundir las almendras amargas con las dulces, ya que se diferencian mucho por su aspecto (color verduzco), olor y sabor; además se debe tener en cuenta que las almendras de la variedad amarga tienen efecto tóxico, ya que al ingerirse se activa el ácido cianhídrico (HCN), que es responsable de envenenamiento (29,38).

Por otro lado, es importante la labor de información por medio del etiquetado de los alimentos, en que se mencione que el procesamiento y envasado de la almendra se hace con maquinaria que también procesa maní y nueces, y así el consumidor este informado y se pueda evitar alergias alimentarias (39). Además, si se tiene una alergia conocida a alguna variedad de nuez, el consumidor podría ser alérgico a los demás y se recomienda que evite todos los tipos de frutos secos (40).

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Hipótesis

La administración de la semilla de *Prunus dulcis* “almendra” tiene efecto neuroprotector sobre el tejido nervioso en ratones inducidos a estrés por desorientación motora.

2.2. Objetivos

2.2.1 Objetivo General

- Determinar el efecto neuroprotector de la administración de la semilla de *Prunus dulcis* “almendra” sobre el tejido nervioso en ratones inducidos a estrés por desorientación motora.

2.2.2 Objetivos específicos

- Determinar los niveles de lipoperoxidación expresado en especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARs) en tejido cerebral tras la administración de *Prunus dulcis* “almendra” en ratones inducidos a estrés por desorientación motora.
- Determinar los niveles de grupos sulfhídricos no proteicos (GS-NP) en tejido cerebral tras la administración de *Prunus dulcis* “almendra” en ratas inducidos a estrés por desorientación motora.
- Determinar los cambios histológicos en el tejido de cerebro y cerebelo tras la administración de *Prunus dulcis* “almendra” en ratones inducidos a estrés por desorientación motora.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Tipo de estudio: Según Argimon (41).

- Por la finalidad del estudio: analítico.
- Por la secuencia temporal: transversal.
- Por el control de la asignación de los factores de estudio: experimental.
- Por el inicio del estudio en relación con la cronología de los hechos: prospectivo.

3.2. Materiales

3.2.1 Material Biológico

Planta: La semilla de *Prunus dulcis* “almendra”.

Animales: Ratones albinos BALB/c (*Mus musculus*) machos, con 3 meses de edad y de $31 \pm 4,4$ g de peso.

3.2.2 Reactivos y fármacos

- DTNB- Reactivo de Ellman (5,5 '-ditiobis-(2-nitrobenzoico) Sigma®
- Ácido 2-tiobarbitúrico. Sigma®
- TCA (Ácido tricloroacético). Sigma®
- EDTA (Ácido Etildiaminotetraacético). Sigma®
- Buffer fosfato 0,01 M pH 7,4
- Etanol, metanol (SPECTRUM®)
- Vitesol E 400®, cápsula blanda (D-alfatocoferol acetato (equivalente a vitamina E 400 UI)

3.2.3 Equipos e instrumentos

- Balanza electrónica Radwag WTB – 200 Max. 200 g d= 0,001g
- Espectrofotómetro NV 203 – Greetmed
- Centrífuga para tubos – Greetmed Modelo GT119-300
- Homogeneizador Ultra Turrax IKA T10 Basic. Dispenser 230 V, 50/60 HZ
- Baño María AVALIER modelo VL-32
- Estufa Unic’s
- Pipeteador de volumen ajustable Kacil

3.3. Muestreo

Método de muestreo: Probabilístico.

El número de ratones fue elegido según juicio de expertos, de un total de 42 y se distribuyeron aleatoriamente (al azar) en seis grupos de siete animales cada uno, dividiéndose en grupos controles y experimentales, asegurando la aleatoriedad del estudio.

3.4. Variables

- **Variable independiente:**

Suspensión de la semilla de *Prunus dulcis* “almendra”: Para la preparación de la suspensión se utilizó las semillas *Prunus dulcis* “almendra” y se trituraron en un mortero de porcelana.

- **Variable dependiente:**

Efecto neuroprotector: Efecto que tiene por objeto prevenir, retrasar o mitigar los procesos neurodegenerativos y evita la pérdida de neuronas, interfiriendo en la cascada de eventos celulares que producen la muerte celular: aumento del estrés oxidativo, liberación de neurotransmisores excitatorios, aumento de calcio, producción de productos tóxicos que

incluyen óxido nítrico y activación de fosfolipasas (42,43).

Definición operacional de variables

Variables	Indicadores	Categorías y puntos de corte	Escala de Medición
Suspensión de la semilla de <i>Prunus dulcis</i> “almendra” según dosis experimentales.	Administración de la suspensión de la semilla de <i>Prunus dulcis</i> “almendra”	Cuantitativa Dosis experimentales: 100 mg/kg 500 mg/kg 1000 mg/kg	Razón
Efecto neuroprotector	Lipoperoxidación expresado en especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARs)	Cuantitativa En comparación con los grupos controles (grupo I y II)	Razón
	Grupos sulfhídricos no proteicos (GS-NP)	Cuantitativa En comparación con los grupos controles (grupo I y II)	Razón
	Cambios histológicos en tejido de cerebro y cerebelo de ratones	Cualitativa En comparación con los grupos controles (grupo I y II)	Razón cualitativa

Prueba piloto

Para el presente estudio se realizó una prueba piloto, para identificar y eliminar los posibles problemas en la administración, la concentración y dosis de la suspensión de semilla de *Prunus dulcis* “almendra”, así como el tiempo que mejor representaba el estrés inducido por la eliminación de bigotes, se sacrificó a los ratones a las 6, 12 y 24 horas después de la eliminación de bigotes y previo tratamiento de 5 días, siendo el tiempo de 12 horas el que mejor representó los indicadores utilizados.

3.5. Método experimental

3.5.1. Condicionamiento y aclimatación de los animales

Los ratones albinos BALB/c (*Mus musculus*) fueron adquiridos del Centro Nacional de Productos Biológicos del Instituto Nacional de Salud (CNPB/INS), y aclimatados en jaulas, provistas de rejillas metálicas, durante una semana a 22 °C, en un ambiente controlado de temperatura, con ciclos alternados de 12 h de luz y 12 h de oscuridad, con libre acceso a una dieta balanceada que fue obtenida en el Centro de Producción de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM) y agua *ad libitum*. Los experimentos se realizaron según los principios internacionales del cuidado y manejo de animales del INS.

3.5.2. Obtención y preparación de la muestra

Las semillas de *Prunus dulcis* “almendra” fueron compradas en un Supermercado de Lima, con marca registrada Valle Alto®, lote D: 1115, que fue elaborado y envasado por PRO VALLE ALIMENTOS S.A.C., empresa que importa la almendra de la variedad Nonpareil del país de Chile, y que son de origen californiano (Estados Unidos). Las almendras fueron conservadas en un ambiente fresco y seco hasta el momento de la experimentación, luego fueron peladas a mano (uso de guantes) y trituradas en un mortero de porcelana, y almacenadas en un frasco ámbar y se mantuvieron en refrigeración (5 °C) hasta el momento del ensayo.

Las muestras fueron suspendidas en agua destilada hasta obtener una suspensión (masa fina), según las dosis experimentales: 100 mg/kg, 500 mg/kg y 1000 mg/kg. Se trabajó con una solución madre a 10 g% para la dosis de 1000 mg/kg, y se diluyó al 1/2 para la dosis de 500 mg/kg y al 1/10 para la dosis de 100 mg/kg.

3.5.3. Método de inducción

Para inducir el estrés por desorientación motora, los ratones fueron capturados a mano, y los bigotes, alrededor de la nariz y la boca, fueron completamente cortados con tijeras, sin el uso de anestesia. Este método fue propuesto por

Talwar SK y col. 2002 (26), con la finalidad de demostrar que el simple corte de bigotes provoca estrés psicológico o emocional en ratones, que conduce al estrés oxidativo en los tejidos.

Los animales fueron distribuidos en 6 grupos (n=7), recibieron el tratamiento (Tabla 1) durante 5 días (antes de la inducción) a las 12 horas del día, por medio de una cánula, vía peroral, y luego del tratamiento los ratones continuaron con libre acceso a una dieta balanceada y agua *ad libitum*.

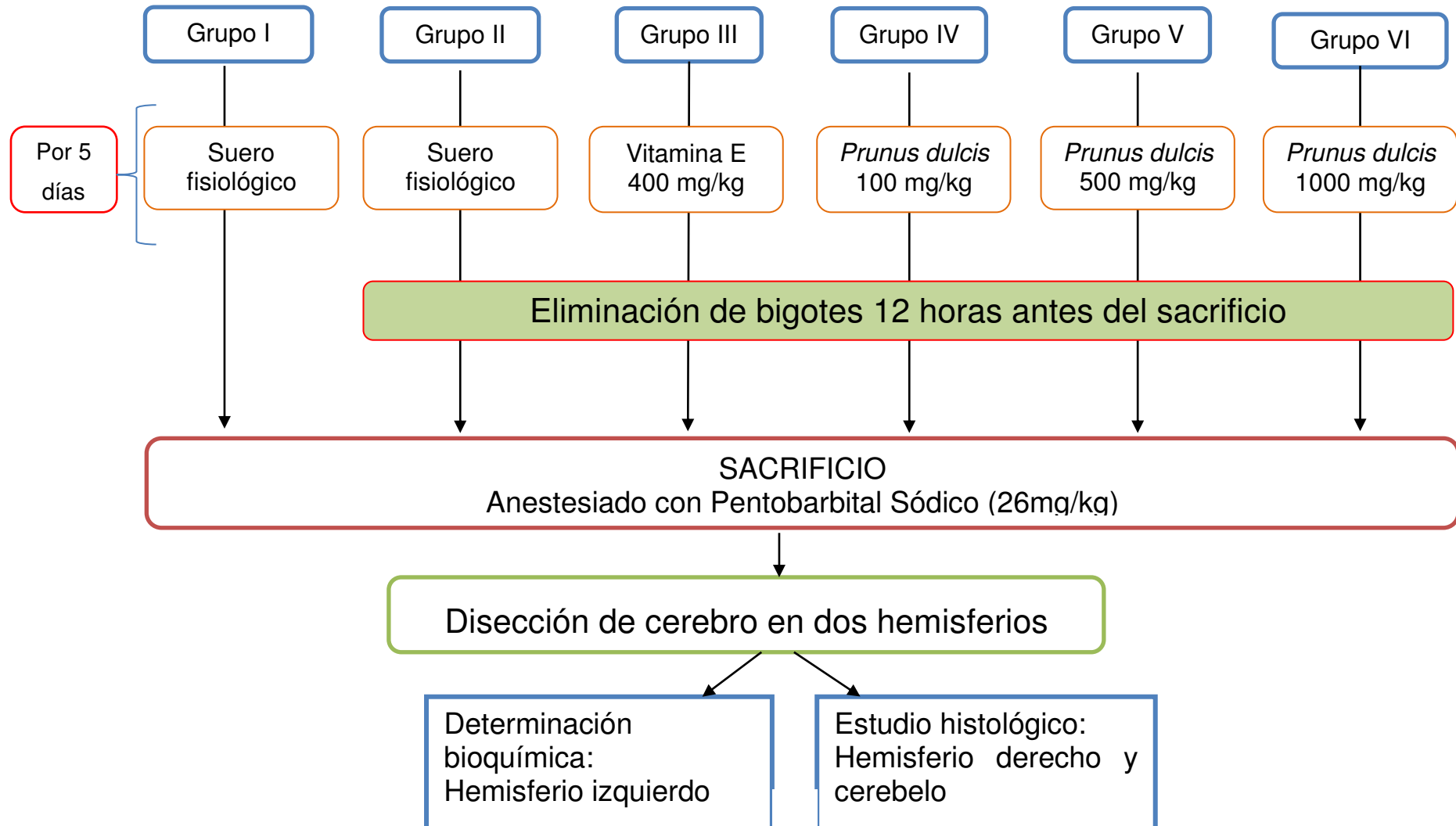
Luego de cumplirse el tratamiento se eliminaron los bigotes de los ratones a las 20 horas. Transcurrido 12 horas, fueron sacrificados previa anestesia con Pentobarbital sódico (26 mg/kg). Se tuvo en consideración que los ratones tienen una mayor actividad locomotora durante la noche (26) (Flujograma).

Tabla 1: Distribución de ratones según grupos de tratamiento

GRUPOS DE TRATAMIENTO (n=7)	TRATAMIENTO (por 5 días)	12 horas antes de culminar el tratamiento
GRUPO I	Suero fisiológico (SF) NaCl 0,9 g% a 10 ml/kg de peso	Con bigotes (C/B)
GRUPO II	Suero fisiológico (SF) NaCl 0,9 g% a 10 ml/kg de peso	Sin bigotes (S/B)
GRUPO III	Vitamina E 400 UI/kg	Sin bigotes (S/B)
GRUPO IV	100 mg/kg de <i>Prunus dulcis</i> “almendra”.	Sin bigotes (S/B)
GRUPO V	500 mg/kg de <i>Prunus dulcis</i> “almendra”.	Sin bigotes (S/B)
GRUPO VI	1000 mg/kg de <i>Prunus dulcis</i> “almendra”.	Sin bigotes (S/B)

FLUJOGRAMA: Diseño experimental

42 ratones machos



3.5.4. Método de determinación

El cerebro y el cerebelo fueron removidos de la cavidad craneana, lavados con NaCl 0,9 %. Los dos hemisferios fueron separados, el hemisferio izquierdo se utilizó para la determinación bioquímica y fue conservado en frío (4°C), y el hemisferio derecho y el cerebelo fueron utilizados para el estudio histológico, los cuales fueron conservados en solución tamponada de formol al 10% (NaCl 0,9%) para su estudio en el Instituto de Patología de la UNMSM-Sede Hospital Nacional Arzobispo Loayza.

3.6. Determinación de los marcadores bioquímicos

Para la determinación de los marcadores bioquímicos se preparó los siguientes homogeneizados de cerebro:

Homogeneizado para lipoperoxidación

Se pesó $0,158 \pm 0,016$ g de tejido de cerebro y se homogeneizó a un volumen final de 2 mL con buffer fosfato 0,01 M pH 7,4.

Homogeneizado para GS-NP

Se pesó $0,158 \pm 0,016$ g de tejido de cerebro en un volumen final de 2 mL con EDTA 0,02 mol/L.

3.6.1. Determinación de los niveles de lipoperoxidación (TBARs)

La determinación de los niveles de lipoperoxidación, es un indicador de lesión de los tejidos inducido por especies reactivas al oxígeno, que es medido por medio de las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARs), se empleó el método de Buege y Aust (1978) (44) y modificado por Suárez (1995) (45).

Fundamento

Mediante la reacción de dos moles de ácido 2-tiobarbitúrico con una mol de malondialdehído, aldehído más significativo en dicha reacción, que es producto de la lipoperoxidación de los ácidos grasos, principalmente de membranas, y que al reaccionar con el ácido tiobarbitúrico, forma un complejo coloreado

(color rosado) con una absorción máxima a los 535 nm, la intensidad de esta coloración será proporcional al grado de oxidación de los ácidos grasos.

Protocolo

Para esta técnica se tomó 0,5 mL de homogenizado de cerebro y se agregó 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 20% en un tubo con tapa, el cual fue sometido a ebullición por 10 minutos en baño María. Luego se retiró y enfrió con agua. Posteriormente se le agregó 1,5 mL de ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) al 0,67% en HCl 0,25 N, y se llevó a baño María hirviente por 20 minutos, se retiró y centrifugó a 3500 RPM por 15 minutos, la absorbancia del sobrenadante se midió en el espectrofotómetro a 535 nm. Para los cálculos se utilizó el coeficiente de extinción molar $1,56 \times 10^5 \text{ mmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ del complejo coloreado formado por el malondialdehído-tiobarbitúrico.

Los resultados se expresaron como nmol/g de peso de tejido húmedo y porcentaje de inhibición, mediante la siguiente formula:

$$TBARs \text{ nmol/g} = \frac{(ABS_{MP-BL}) \times VH \times Vrx \times 10}{1,56 \times Wc \times VHRx}$$

ABS_{MP-BL}: absorbancia de la muestra restado del blanco reactivo

VH: Volumen del homogenizado (2 mL)

Vrx: Volumen de la reacción (3 mL)

Wc: peso del tejido a homogenizar

VHRx: volumen del homogenizado empleado para la reacción (0,5 mL)

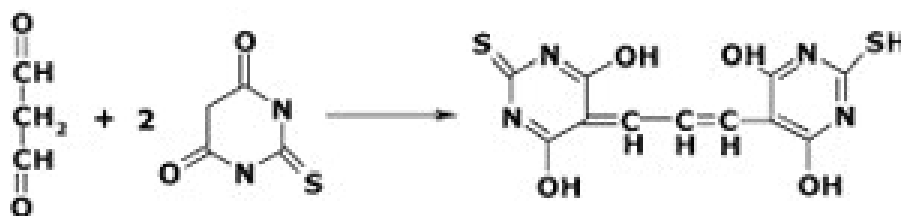


Figura 1: Reacción de TBA con 2 MDA que forma el complejo coloreado a 535 nm. Analytical Methods for Resolving Data From TBA₂-MDA Reaction Mixtures (46)

$$\% \text{ inhibición} = \frac{IGC - IMP}{IGC} \times 100$$

IGC: índice de la media del grupo control (grupo II)

IMP: índice de la media de la muestra problema

3.6.2 Determinación de Grupos Sulfhídricos no proteicos (GS-NP)

La determinación de los niveles de GS-NP, es un indicador de protección antioxidante a nivel cerebral, siendo el glutatión (GSH) el componente mayoritario de los compuestos con grupo sulfhídrico no proteico (95-98 %), se aplicó el método de Sedlak y Lindsay 1968 (47).

Fundamento

La oxidación de los grupos sulfhídricos por el ácido 5,5-ditiobis (2-nitrobenzoico) (DTNB), produce la formación de un mol de ácido 2-nitro-5-tiobenzoico (TNB), que fue leído a 412 nm.

Protocolo

Para esta técnica se tomó 1 mL del homogenizado en un tubo de centrifuga, 2 mL de ácido tricloroacético al 50% (TCA) y 0,8 mL de agua, se mezcló y se reposó por 15 minutos, luego se centrifugó a 5000 rpm por 5 minutos. Se tomó 0,5 mL del sobrenadante y se agregó 2 mL de buffer TRIS 0,4 mol/L, pH 8,9 luego se añadió 0,025 mL de DTNB 0,01 mol/L y mezcló. Luego fue leído a 412 nm antes de los 5 minutos, y se procede a registrar las absorbancias, se expresa los resultados como ug GSH/mL/g de tejido y porcentaje de incremento, el cual fue determinado por la siguiente formula:

$$GS-NP \mu g/g = \frac{FC \times (ABS_{MP-BL}) \times VH \times Vrxp \times VRf}{Wc \times Vsn}$$

FC: 65,676 $\mu\text{mol}\%$

ABS_(MP-BI): absorbancia de la muestra problema restado del blanco reactivo.

VH: Volumen del homogenizado (2mL)

Vrxp: volumen de la reacción precipitante (2,2 mL)

VRf: volumen de la reacción final (2,525 mL)

Wc: peso del tejido cerebral

Vsn: volumen del sobrenadante (0,5 mL)

$$\% \text{ incremento} = \frac{IMP-IGC}{IGC} \times 100$$

IMP: índice de la media de la muestra problema

IGC: índice de la media del grupo control (grupo II)

3.6.3 Procedimiento para el estudio histopatológico

Los cortes histológicos de tejido de nervioso (cerebro y cerebelo) fueron procesados en el Instituto de Patología de la UNMSM-Sede Hospital Nacional Arzobispo Loayza, leídos y analizados por el Dr. José Ernesto Raez Gonzales, medico Anátomo Patólogo. Para el estudio histológico de cerebro, se practicó cortes dividiendo al cerebro en hemisferios, se utilizó el hemisferio derecho y el cerebelo, y fueron fijados en formol neutro al 10%, luego se enviaron al laboratorio de Patología de la UNMSM para su respectivo estudio. Para la lectura de las láminas se utilizó la tinción hematoxilina eosina, la hematoxilina es un colorante básico y colorea a los ácidos nucleicos presentes en el núcleo tiñéndolas de color morado, y la eosina es un colorante ácido que tiñe la mayoría de las proteínas citoplasmáticas de un color rojo o rosado muy fuerte. Se evidenció en el cerebro el núcleo, nucléolo y citoplasma de las neuronas piramidales, neuroglias y en el cerebelo las células de Purkinje.

3.7 Análisis de datos

Luego de la ejecución del diseño experimental, los datos recogidos fueron ordenados y analizados. Los datos fueron ingresados a una hoja de cálculo en MS-Excel 2010, para ser procesados luego mediante el programa estadístico SPSS 20. Primero se realizó un análisis descriptivo expresado en promedios y desviación estándar.

Se realizó la prueba de normalidad de Shapiro Wilk, para seleccionar las pruebas de hipótesis estadísticas adecuadas. Luego se aplicó la prueba de análisis de varianza (ANOVA), para comparar medias de más de dos muestras independientes, y se realizó la prueba de homogeneidad de varianzas, utilizando el estadístico de Levene, y se realizó la prueba de Games – Howell (varianzas diferentes), considerado como significativo un valor de $p < 0,05$. Por ultimo, se comparó medias entre grupos.

3.8 Consideración ética

En el aspecto ético, según la Ley Peruana N °27265 de la protección a los animales domésticos y a los animales silvestres mantenidos en cautiverio, en el Título IV, de la experimentación e investigación y la docencia, se permite la experimentación para el estudio y el avance de la ciencia, cuando el mismo resulte necesario para el tratamiento de enfermedades que afecten tanto al hombre como a los animales y siempre que no se afecte la naturaleza del experimento o investigación, y se establecerán procedimientos para mitigar el sufrimiento del animal (48).

Además, la investigación biomédica en animales es éticamente aceptable, si se sigue el principio de las tres R de la experimentación humanizada para con los animales, propuesta por William Russell (zoólogo y psicólogo) y Rex Burch (microbiólogo) en 1959: Reducir, Reemplazar y Refinar (49).

IV. RESULTADOS

Al aplicar la prueba de Shapiro Wilk se determinó que los indicadores empleados en este estudio presentaron una distribución normal, y se utilizó la prueba ANOVA y Post Hoc de Games - Howell ya que las muestras tuvieron varianzas diferentes.

4.1 Niveles de lipoperoxidación en tejido cerebral

Se observó que tras la eliminación de bigotes los niveles de lipoperoxidación expresados en especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) se incrementaron significativamente en el tejido cerebral (grupo II) en comparación al grupo I ($p < 0,05$).

El grupo III que recibió el tratamiento con vitamina E 400 UI/kg y sin bigotes, produjo una disminución significativa de los niveles de lipoperoxidación en comparación con el grupo II, teniendo una disminución mayor en comparación con los grupos IV, V y VI, además no se encontró diferencia significativa con el grupo I.

Se observó que los grupos V y VI (500 y 1000 mg/kg respectivamente) obtuvieron resultados similares, teniendo estos una disminución significativa en comparación el grupo II ($p < 0,05$), pero menor en comparación con el grupo III. Sin embargo, el grupo que recibió la menor dosis de almendra (grupo IV) expreso niveles altos de lipoperoxidación, sin tener diferencias significativas con el grupo II (Tabla 2).

Tabla 2: Lipoperoxidación en homogenizado de cerebro según grupo de tratamiento

Grupo de Tratamiento	Lipoperoxidación ^a (nmol/g de tejido)	% de inhibición
Grupo I	25,78±5,43	--
Grupo II	45,44±13,00 ^c	--
Grupo III	27,26±2,57 ^b	40,00
Grupo IV	39,38±3,16 ^c	13,34
Grupo V	31,92±2,20 ^{b,c}	29,75
Grupo VI	32,32±3,17 ^{b,c}	28,87

^a Media ± DE (n=7)

^b p<0.05 grupo II comparado con el grupo I, III, V y VI.

^c p<0.05 grupo III comparado con grupo IV, V y VI.

ANOVA Prueba Post Hoc Games – Howell (varianzas diferentes).

4.2 Niveles de grupos sulfhídricos no proteicos en tejido cerebral

Se observó que tras la eliminación de bigotes los niveles de GS-NP se incrementaron en el tejido cerebral (grupo II) en comparación al grupo I, pero sin ser significativo (p>0,05).

El grupo III, tratamiento con vitamina E 400 UI/kg y sin bigotes, produjo un incremento de los GS-NP, p≤0,05, en comparación con el grupo I, sin embargo no hubo diferencia significativa con el grupo II. Los grupos IV y V tuvieron un aumento significativo (p<0,01) en comparación con el grupo III, , y el grupo VI no tuvo diferencias significativas con este grupo.

Se observó que los grupos IV y V obtuvieron resultados similares, siendo estos superiores en comparación al grupo II y III (p<0,01), sin embargo el grupo que recibió la mayor dosis de almendra (grupo VI) expuso niveles inferiores de

GS-NP en comparación a lo observado en el grupo IV y V, alcanzando niveles similares a los encontrados en el grupo I y II, y sin diferencias significativas (Tabla 3).

Tabla 3: Grupos sulfhídricos no proteicos^a (GS-NP) en homogenizado de cerebro de ratones según grupo de tratamiento

Grupo de Tratamiento	GS-NP ($\mu\text{g/mL/g}$ de tejido)	% de incremento
Grupo I	14,20 \pm 0,39 ^c	--
Grupo II	16,15 \pm 1,75	--
Grupo III	18,58 \pm 1,08	15,04
Grupo IV	25,43 \pm 2,24 ^{b,c}	57,46
Grupo V	24,78 \pm 1,93 ^{b,c}	53,44
Grupo VI	14,72 \pm 0,85 ^c	-8,86

^a Media \pm DE (n=7)

^b p<0.01 grupo II comparado con el grupo IV y V.

^c p<0.01 grupo III comparado con grupo I, IV, V y VI. ANOVA Prueba Post Hoc Games – Howell (varianzas diferentes).

4.3 Cambios histológicos del tejido nervioso:

La descripción histológica de los tejidos del cerebro y cerebelo de los ratones con desorientación motora identifico la presencia de:

Grupo I: En el cerebro se observó que la capa granulosa, la corteza cerebral (Figura 2) y la zona límbica (hipocampo), en el área de cuerno a Amón (AC 1), no tuvieron alteraciones histológicas (Figura 3); y respecto al cerebelo, las células de Purkinje se encontraron normales con un número mayor a 8 x campo (Figura 4).

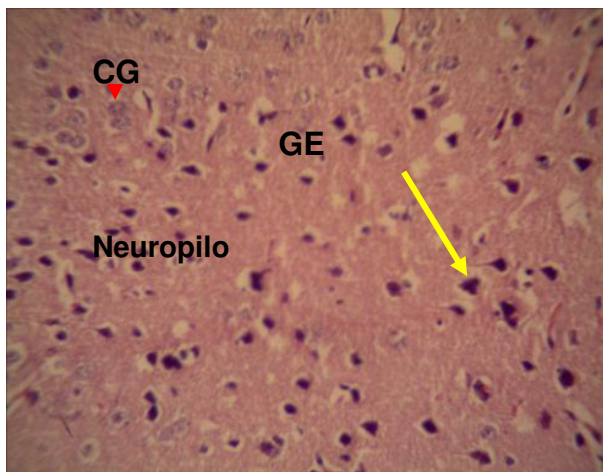


Figura 2: Microfotografía de la corteza cerebral del grupo I (con bigotes/sin tratamiento) se observa la capa II (granulosa externa), existe la presencia de neuronas piramidales pequeñas (flecha) y células granulosas (CG) normales. Tinción H-E 40 x'.



Figura 3: Microfotografía del hipocampo (zona límbica) del grupo I (con bigotes/sin tratamiento) se evidencia el área CA1, con neuronas piramidales (flecha) normales. Tinción H-E 40 x'.

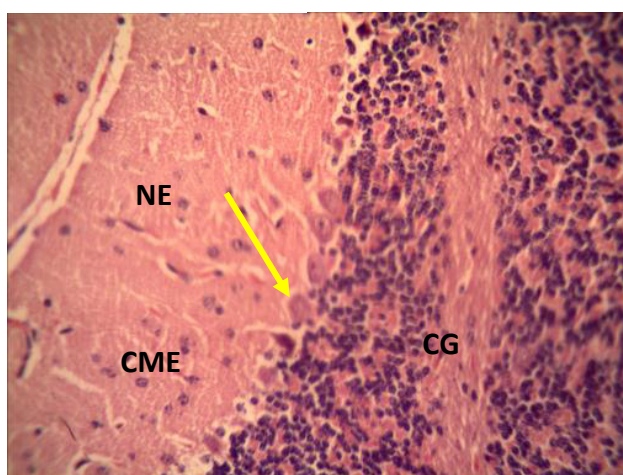


Figura 4: Microfotografía del cerebelo del grupo I (con bigotes/sin tratamiento) observamos la capa molecular externa (CME), capa de células de Purkinje 8 x campo (flecha), capa granulosa (CG), y neuronas en cesto (NE) normales. Tinción H-E 40 x'.

Grupo II: En el cerebro se observó que el 80% de las muestras evidenciaron una capa granulosa normal y el 20% con una disminución leve de las células. En la corteza cerebral se evidencia un aumento de las microglías siendo leve el 40%, moderado el 20% y severo el 20% de las muestras (Figura 5). En la zona límbica, en el área de cuerno a Amón (AC 1), se observó a las células piramidales sin cambios en número ni composición, pero si existió la presencia de edema leve en el 80% de las muestras (Figura 6). En el núcleo basal se observó normalidad en las células, aunque el 20% presentó un aumento leve

de microglías. En el cerebelo, se observó una disminución de las células de Purkinje a 5 x campo en el 60% y la presencia de un edema leve en el 40% de las muestras (Figura 7).

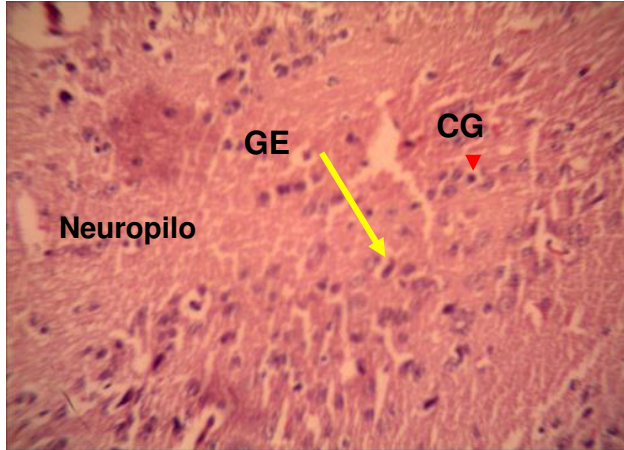


Figura 5: Microfotografía de la corteza cerebral del grupo II (sin bigotes/sin tratamiento) se observa la capa II (granulosa externa GE) presenta un aumento del número de micro y macroglías (CG), y neuronas piramidales con edema leve (flecha). Tinción H-E 40 x'.

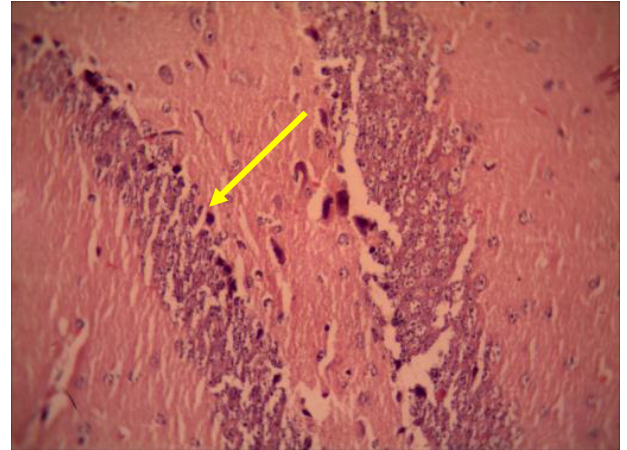


Figura 6: Microfotografía del hipocampo (zona límbica) del grupo II (sin bigotes/sin tratamiento) se evidencia el área CA1, con neuronas piramidales con edema leve (flecha). Tinción H-E 40 x'.

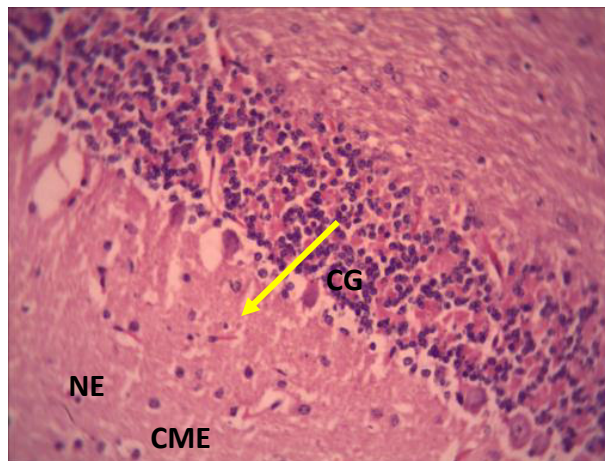


Figura 7: Microfotografía del cerebelo del grupo II (sin bigotes/sin tratamiento) observamos la capa molecular externa (CME), capa granulosa, neuronas en cesto (NE) normales y las células de Purkinje presentan ligera inflamación (flecha). Tinción H-E 40 x'.

Grupo III: En el cerebro se evidenció que en la zona granulosa el 80% de las muestras se encontraba normal y el 20% tuvo un ligero adelgazamiento. En la corteza cerebral el 80% de las muestras presentó un aumento leve de las glías

(macro y microglías), además existió la presencia de edema siendo leve en el 80% y 20% moderado (Figura 8). En la zona límbica 60%, en el área de cuerno a Amón (AC 1), de las muestras presentó una disminución de neuronas y la presencia de edema leve en un 20% y edema moderado en un 40% (Figura 9). En el nivel basal se observó edema leve en un 40% y 20% edema moderado. En el cerebelo, las células de Purkinje no presentaron cambios, y un 40% de las muestras evidenciaron edema leve (Figura 10).

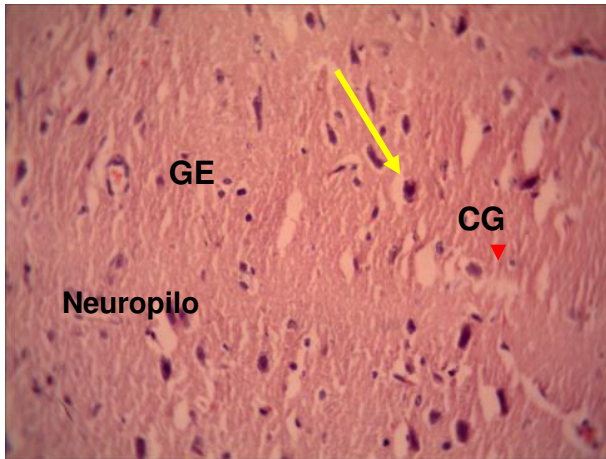


Figura 8: Microfotografía de la corteza cerebral del grupo III (vitamina E/sin bigotes) se observa la capa II (granulosa externa GE) presenta un aumento del número de micro y macroglías (CG), y neuronas piramidales con edema leve en la mayoría (flecha). Tinción H-E 40 x'.

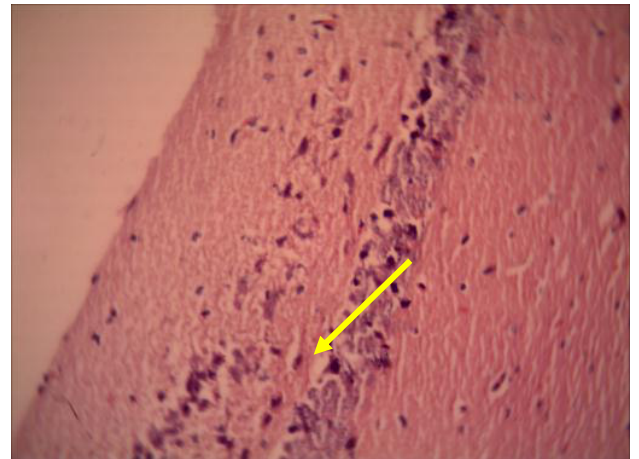


Figura 9: Microfotografía del hipocampo (zona límbica) del grupo II (sin bigotes/sin tratamiento) se evidencia el área CA1, con desorden, disminución de neuronas piramidales y edema leve (flecha). Tinción H-E 40 x'.

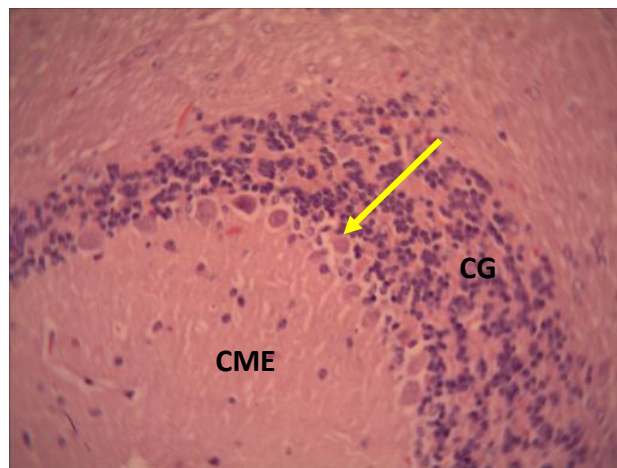


Figura 10: Microfotografía del cerebelo del grupo II (sin bigotes/sin tratamiento) se observa la capa molecular externa (CME), la capa granulosa (CG), normales y las células de Purkinje con ligero edema (flecha). Tinción H-E 40 x'.

Grupo IV: En el cerebro se observó, que en la zona granulosa no hay evidencia de cambios o daño histológico. En la corteza cerebral hubo un aumento leve de glías (macro y microglías) en todas las muestras, y presencia de edema leve en el 60% y moderado en el 20% (Figura 11). La zona límbica, en el área de cuerno a Amón (AC 1), tuvo un aumento de las neuronas piramidales en el 20%, y no se evidenció la presencia de edema (Figura 12). En el nivel basal en el 40% existió edema leve y en un 20% edema severo. En el cerebelo el número de células de Purkinje no sufrió cambios, pero el 40% presentó una coloración pálida (Figura 13).

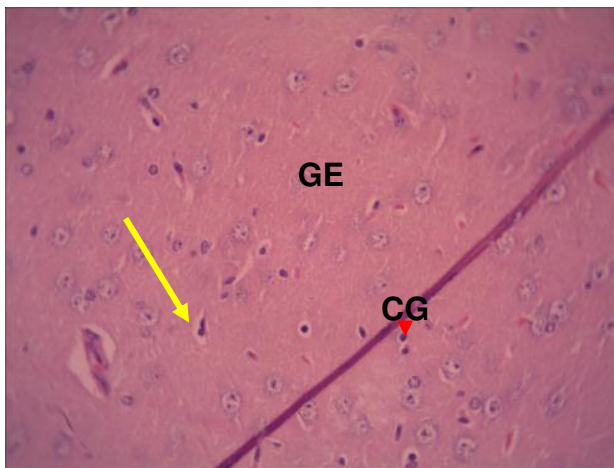


Figura 11: Microfotografía de la corteza cerebral del grupo IV (almendra 100 mg/kg /sin bigotes), se observa la capa II (granulosa externa GE) presenta un aumento leve del número de micro y macroglías (CG), y neuronas piramidales con edema leve en la mayoría (flecha). Tinción H-E 40 x'.

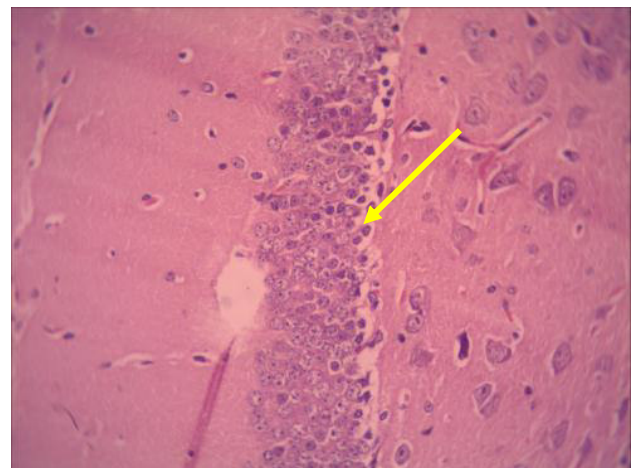


Figura 12: Microfotografía del hipocampo (zona límbica) del grupo IV (almendra 100 mg/kg /sin bigotes), se evidencia el área CA1, con aumento leve de neuronas piramidales (flecha). Tinción H-E 40 x'.

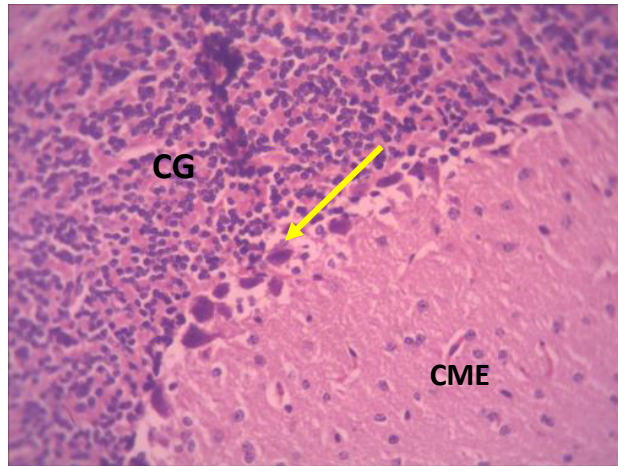


Figura 13: Microfotografía del cerebelo del grupo IV (almendra 100 mg/kg /sin bigotes), se observa la capa molecular externa (CME), la capa granulosa (CG) y las células de Purkinje normales (flecha). Tinción H-E 40 x'.

Grupo V: En el cerebro se observó, que la zona granulosa no presentó cambios. La corteza cerebral tuvo un aumento leve de glías (macro y microglías) y presencia de edema leve en el 60% y edema moderado en un 20% de las muestras (Figura 14). En la zona límbica, en el área de cuerno a Amón (AC 1), las neuronas piramidales se encontraron normales, aunque un 20% tuvo una coloración pálida y el 60% presentó un edema leve (Figura 15). En el nivel basal el 80% presentó edema leve. En el cerebelo el 40% de las células de Purkinje se encontraron pálidas. Solo el 20% de las muestras presentó edema leve (Figura 16).



Figura 14: Microfotografía de la corteza cerebral del grupo V (almendra 500 mg/kg /sin bigotes), se observa la capa II (granulosa externa GE) presenta un aumento leve del número de micro y macroglías (CG), y neuronas piramidales con edema leve en la mayoría (flecha). Tinción H-E 40 x'.

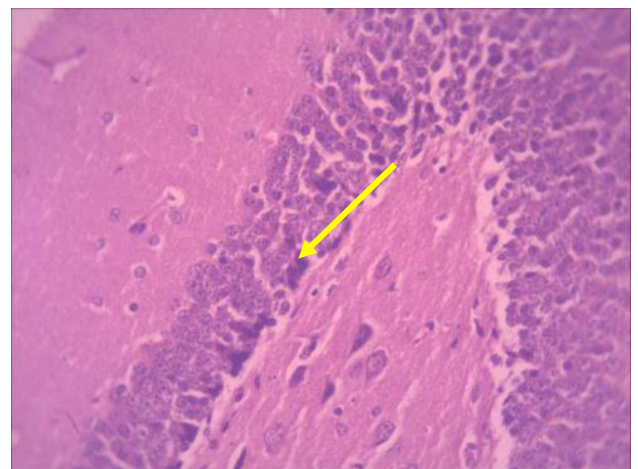


Figura 15: Microfotografía del hipocampo (zona límbica) del grupo V (almendra 500 mg/kg /sin bigotes), se evidencia el área CA1, con aumento leve de neuronas piramidales (flecha). Tinción H-E 40 x'.

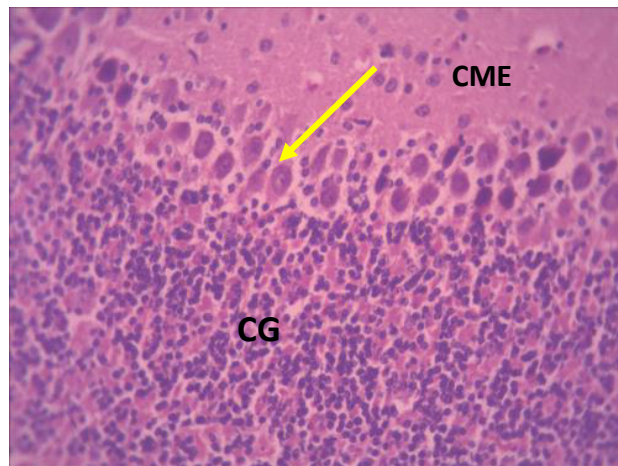


Figura 16: Microfotografía del cerebelo del grupo V (almendra 500 mg/kg /sin bigotes), observamos la capa molecular externa (CME), la capa granulosa (CG), y las células de Purkinje normales (flecha). Tinción H-E 40 x'.

Grupo VI: En el cerebro, se evidenció que el 40% de las muestras de la zona granulosa presentó adelgazamiento de la capa. La corteza cerebral tuvo un aumento leve de las macroglías (60%) y presencia de edema leve el 60%, edema moderado 20% y edema severo 20% del total de las muestras (Figura 17). La zona límbica, en el área de cuerno a Amón (AC 1), el 40% presentó una disminución leve del número de neuronas piramidales y el 20% de las muestras presentó núcleo pigmentado con infiltración grasa, además el 60% evidenció edema leve y el 20% edema moderado (Figura 18). En el nivel basal existió edema leve en un 80% y edema moderado en un 20%. En el cerebelo el 80% de las células de Purkinje se encontraban normales, y el 20% tuvieron una coloración pálida, solo el 20% de las muestras presentó edema moderado (Figura 19).



Figura 17: Microfotografía de la corteza cerebral del grupo VI (almendra 1000 mg/kg /sin bigotes), se observa la capa II (granulosa externa GE) presenta un aumento leve del número de micro y macroglías (CG), y neuronas piramidales con edema leve en la mayoría (flecha). Tinción H-E 40 x'.

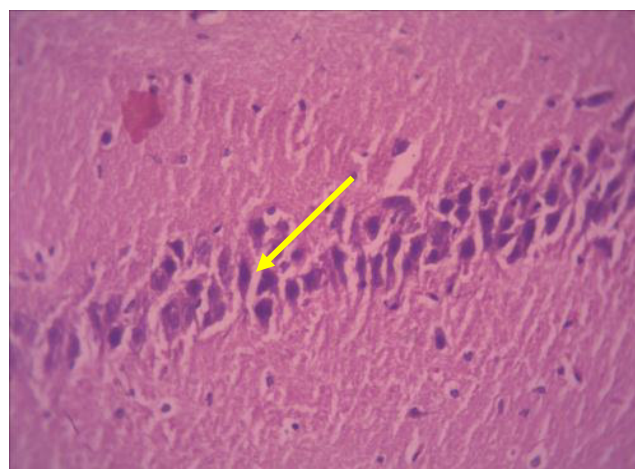


Figura 18: Microfotografía del hipocampo (zona límbica) del grupo VI (almendra 1000 mg/kg /sin bigotes), se evidencia el área CA1, disminución de neuronas piramidales y edema leve (flecha). Tinción H-E 40 x'.

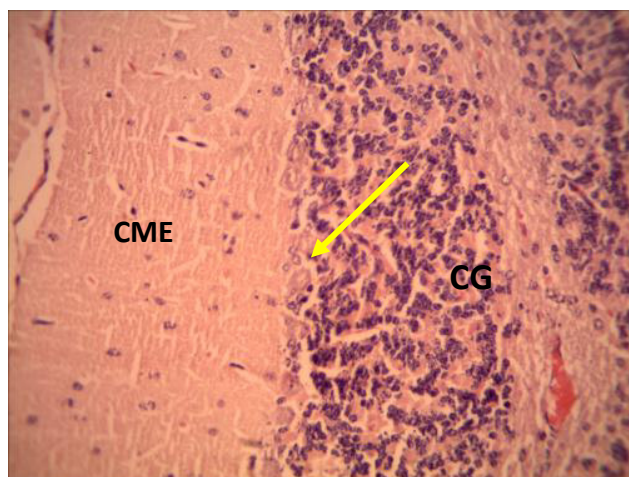


Figura 19: Microfotografía del cerebelo del grupo VI (almendra 1000 mg/kg /sin bigotes), observamos la capa molecular externa (CME), la capa granulosa (CG), y la minoría de células de Purkinje fue pálida y con presencia de edema moderado (flecha). Tinción H-E 40 x'.

V. DISCUSIÓN

En el presente estudio, se observó un aumento significado de los niveles de lipoperoxidación expresado en TBARs en el grupo II (sin bigote, sin tratamiento), en comparación con el grupo I (con bigotes, sin tratamiento) (Tabla 2), que demuestra una prueba del daño sobre los ácidos grasos polinsaturados por el modelo de estrés inducido a desorientación motora por medio de la eliminación de bigotes. Este modelo induce a un aumento de tensión y ansiedad, originando un desequilibrio entre el estrés oxidativo y los componentes antioxidantes (15) presentes en tejido cerebral, y como resultado origina el proceso de oxidación de ácidos grasos (lipoperoxidación) principalmente de los fosfolípidos que se encuentran en la membrana celular (20).

Estos resultados también se evidenciaron en los estudios realizados por Kim H-G y col. 2014 (15) y Rahman y col. 2008 (50), en que también utilizaron como método de inducción de estrés la eliminación de bigotes, y se encontró que los niveles de TBARs aumentaron significativamente en comparación con el grupo control.

En relación a los grupos de tratamiento con la almendra (G IV, G V y G VI) en las tres dosis experimentales, disminuyeron los niveles de lipoperoxidación (TBARs) en el tejido cerebral, siendo solo los grupos V y VI los que mostraron una disminución significativa del 29,8% y 28,9 % respectivamente, pero sin llegar a los niveles observados por el grupo I y grupo III; el grupo IV solo disminuyó en un 13%, respecto al grupo II (Tabla 2), lo que podría indicarnos que los efectos son dosis dependiente.

Estos resultados podrían estar relacionados con los componentes de la almendra, la cual es una de las fuentes más ricas de vitamina E (α -tocoferol), también contienen una variedad de compuestos fenólicos, incluyendo flavonoles (isoramnetina, kaempferol, quercetina), flavanoles (catequina, epicatequina), flavanonas (naringenina), antocianinas (cianidina, delphinidina), procianidinas (B2 y B3), y ácidos fenólicos (ácido cafeico, ácido ferúlico, p -

ácido cumárico, ácido protocatéquico, ácido vinílico) (51), componentes con capacidad antioxidante. También destaca el contenido de ácidos grasos insaturados, principalmente monoinsaturados (MUFA) y poliinsaturados (PUFA) (29,30).

Los flavonoles y flavanoles de la almendra han demostrado ser biodisponibles y contribuir a la protección antioxidante contra la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL-C) en *in vitro* e *in vivo* (51,52). Además un aumento de la ingesta de MUFA en la dieta también se ha asociado con una reducción de la susceptibilidad de la LDL a la oxidación (51,53). Diversos flavonoides han mostrado su eficiencia para eliminar los procesos de peroxidación lipídica del ácido linoleico o de los fosfolípidos de las membranas, la peroxidación de los glóbulos rojos o la autooxidación de los homogeneizados de cerebro (67). Por lo tanto, hay una serie de componentes de las almendras que podrían atribuirse a la reducción de la oxidación de LDL y se prevé que puede reducir el daño oxidativo en las membranas celulares, como se observa en estudios anteriores (51).

El estudio de Rahman y col. 2008, nos reportó que una mezcla de antocianinas (flavonoide), presente en el extracto de *Vaccinium myrtillis* L., disminuyó los niveles de TBARs en cerebro, corazón, riñón e hígado, empleando la técnica de eliminación de bigotes, estos resultados apoyan que las antocianinas, también presentes en la almendra, funcionan como antioxidantes *in vivo*; según el autor, atribuye estos resultados a la presencia de polifenoles, y lo cual sugiere su uso en el tratamiento de trastornos cerebrales relacionados con el estrés oxidativo, aunque no se concluye que el flavonoide atraviese la barrera hematoencefálica (50,54).

En el estudio de Kim H-G 2014, se utilizó el extracto etanólico de *Myelophil* (efecto antioxidante y antiinflamatorio), y la técnica de eliminación de bigotes de ratas, se observó que los niveles de lipoperoxidación (TBARs) en los grupos de tratamiento previo con *Myelophil* tuvieron una disminución significativa en el hipocampo en comparación con el control, ya que el hipocampo es una de las áreas más susceptibles al daño oxidativo; mientras que en la corteza cerebral

la disminución no fue significativa (15).

En el grupo III, tratado con vitamina E y sin bigotes, se observó una disminución significativa del 40% de TBARs ($p < 0,05$), en comparación con el grupo II, sin existir diferencia significativa con el grupo I (Tabla 2). Estos resultados se explicarían por las propiedades antioxidantes de la vitamina E (α -tocoferol). La vitamina E posee la más alta biodisponibilidad en humanos, y retarda o impide la producción de radicales libres, protegiendo los ácidos grasos poliinsaturados de las reacciones de lipoperoxidación, evitando así la acumulación de metabolitos tóxicos durante el estrés (55). La actividad antioxidante de la vitamina E puede convertir los radicales libres en compuestos menos reactivos y, por tanto, proteger los componentes celulares que son vitales para el correcto funcionamiento y la supervivencia de los sistemas complejos (56).

Los resultados observados en el presente estudio en relación al grupo III, son semejantes con lo encontrado por Celikbilek y col. 2014, en que se midió los niveles de TBARs en diferentes modelos de estrés: inmovilización, frío e inmovilización-frío, en este estudio se administró la vitamina E (30 mg/kg/día) intramuscular. En todos los grupos tratados con vitamina E, los niveles de TBARs disminuyeron significativamente, alcanzando los niveles observados por el grupo control. En consecuencia, la vitamina E podría ser un agente útil para la prevención de alteraciones causadas por la lipoperoxidación producida por el estrés oxidativo en los diferentes modelos de estrés (57). Es oportuno indicar que la almendra presenta niveles altos de vitamina E (α -tocoferol), según el estudio de Chen y col. 2006 (27).

Además, el estudio de La Fata Giorgio y col. 2014, nos dice que el tratamiento con vitamina E ha demostrado retrasar el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer (EA), aunque en este estudio el efecto neuroprotector de la vitamina E parece estar relacionado a la combinación de sus 8 diferentes isoformas (tocoferoles y tocotrienoles), en lugar de solo alfa-tocoferol (55).

La protección a nivel cerebral puede ser evaluada por diversos metabolitos y uno de ellos es la medición de los niveles de grupos sulfhídricos no proteicos en

tejido de cerebro, siendo el glutatión reducido (GSH) el componente de los que va a poseer el 95-98% de este grupo sulfhídrido. La disminución de los niveles de GS-NP está relacionada con el estrés oxidativo, que pondría en evidencia el desequilibrio entre el estrés oxidativo y los antioxidantes (GSH) en el tejido cerebral (22).

En el presente estudio, se observó un aumento de los niveles de GS-NP en el grupo II (sin bigote, sin tratamiento), en comparación con el grupo I (con bigotes, sin tratamiento), sin embargo, esta diferencia no fue significativa (Tabla 3). Estos resultados podrían atribuirse a que el estrés por desorientación motora, afecta principalmente a las enzimas superóxido dismutasa (SOD) y catalasa, y por lo tanto son las que tendrían una mayor disminución después de la eliminación de bigotes (15).

Estos resultados se contrastan con los encontrados por Kim H-G et al. (2014), en que los niveles de glutatión totales (glutatión reducido y oxidado) disminuyeron significativamente en la corteza cerebral e hipocampo después de la eliminación de bigotes (15).

Tras el tratamiento con almendra los niveles de GS-NP se incrementaron significativamente ($p < 0,01$), en los grupos IV y V, con un 57% y 53% respectivamente (Tabla 3). Esto se podría deber a los componentes de la almendra, rica principalmente en vitamina E (α -tocoferol) y compuestos fenólicos ya citados anteriormente (51), pero además se podría atribuir al selenio presente en la almendra (4 mg/100g) (58), este oligoelemento tiene un papel importante en el cerebro; ya que la forma de selenocisteína (selenoproteína), es cofactor de la glutatión peroxidasa (GPx), enzima que reduce el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y los hidroperóxidos, utilizando como agente reductor el glutatión reducido (GSH), lo cual da lugar a productos no dañinos (agua y alcoholes) y mejora de la protección antioxidante (59); además tiene un mecanismo de acción estrechamente relacionado con el de la vitamina E. El estudio de Chen y col. 2000, informa que la selenoproteína P posee actividad antioxidante y capacidad para promover la supervivencia de las células neuronales (60).

Los grupos IV y V presentaron un aumento significativo de GS-NP en comparación con el grupo III, esto podría estar relacionado a un probable sinergismo de los componentes de la almendra (principalmente vitamina E y fenoles) el cual podría potenciar su efecto antioxidante. El estudio realizado por Ferri y col. 2014, demostró que α -tocoferol es capaz de promover el transporte de quercetina a través de la barrera hematoencefálica, aunque el mecanismo aún sigue sin estar claro, estos resultados se podrían deber a la capacidad del α -tocoferol para inhibir la glicoproteína P, una glicoproteína de membrana, que es ampliamente distribuida en las neuronas y astrocitos, y que va a permitir el flujo de salida de xenobióticos fuera de la célula; también a la capacidad de α -tocoferol para inhibir a la proteína quinasa C (PKC) por medio de la activación de la proteína fosfatasa 2A, perjudicando así el mecanismo de fosforilación-desfosforilación del transporte de quercetina a través de la BHE, que controla la entrada y salida de flujo de metabolitos. Por otro lado, además los flavonoides tienen la capacidad de proteger al α -tocoferol de la oxidación en plasma, todo ello podría llevar a un aumento significativo de α -tocoferol y de la concentración de quercetina en el cerebro, lo que fundamenta los resultados encontrados, en que la vitamina E y quercetina aumentan los efectos antioxidantes de la almendra (61).

Tras el tratamiento con almendra los niveles de GS-NP disminuyeron en el grupo VI en comparación con el grupo III, y alcanzo niveles similares al grupo I, es decir, no se evidenció algún mecanismo de defensa antioxidante, esto se podría explicar por una posible actividad prooxidante (a dosis altas) de los componentes de la almendra, principalmente vitamina E y flavonoides (62).

En el grupo III, tratado con vitamina E y sin bigotes, se observó un incremento del 15% de GS-NP en comparación con el grupo II, sin ser significativo. Hubo un aumento significativo en el grupo III en comparación al grupo I (Tabla 3). Estos resultados se podrían deber a que aunque α -tocoferol es la forma más abundante y biodisponible de la vitamina E en los tejidos humanos, en los estudios de Frank y col. 2012 (63) y Servinova y col. 1991 (64), se demostró que los tocotrienoles pueden captar los radicales libres más potentes en comparación con α -tocoferol, en condiciones experimentales específicas.

También se podría deber a las diferentes formas químicas presentes en los suplementos de vitamina E y en los alimentos, así como su biodisponibilidad. Además, la combinación de nutrientes de los alimentos, pueden tener efectos interactivos y sinérgicos sobre la salud, como lo explicado anteriormente en el estudio de Ferri y col. 2014 (55-61).

En relación al estudio histológico en el grupo II (sin bigote, sin tratamiento) se observó la presencia de edema leve (20%) en las células de la capa granulosa, en la corteza cerebral hubo un aumento de microglías (40% leve, 20% moderado y 20% severo), en la zona límbica el edema fue leve (80%); y en el cerebelo hubo una disminución en el número de la células de Purkinje a 5 x campo y edema leve (40%).

Estos resultados nos dan a conocer el daño a nivel histológico que produce la eliminación de bigotes, ya que a este nivel se genera una reacción inflamatoria, principalmente dada por la presencia de citoquinas proinflamatorias (IL-1, IL-6 y TNF), que producen la activación de neuroglías como mecanismo de defensa, estas neuroglías participan en procesos de inflamación y reparación del sistema nervioso, y se observa también edema debido a la presencia del estrés oxidativo. La oxidación de las moléculas que conforman la membrana celular van a alterar su permeabilidad selectiva, lo que conduce a una pérdida del equilibrio osmótico de las células, produciendo la entrada no controlada de sodio y agua, alterando las concentraciones de electrolitos, y desencadenando otras series de reacciones, en que destaca la presencia de edema de diversa intensidad (65).

En el estudio de Kim H-G et al. (2014), se observó que en el grupo control hubo lesiones en el tejido cerebral tanto en la corteza cerebral y en el hipocampo (especialmente en el área de Cuerno de Amón 1 (AC 1), las células se condensaron y encogieron en la corteza cerebral y estas alteraciones también se observaron en la región del hipocampo, esto debido a que son las áreas más susceptibles al daño oxidativo, por tener una capacidad antioxidante reducida (15).

En relación a los cambios histológicos, en los grupos con tratamiento con

almendra (grupo IV, V y VI) y vitamina E (grupo III), se observó una disminución leve del edema y de microglías en la corteza cerebral, principalmente en los grupos IV y V (dosis de 100 mg/kg y 500 mg/kg respectivamente).

Estos resultados se podrían deber a que altas concentraciones de cortisol causan atrofia del hipocampo y corteza cerebral, lo que podría ser parte de la patogénesis de las enfermedades neurodegenerativas tales como la enfermedad de Alzheimer o la enfermedad de Parkinson (15). Además, en el estudio de Rahman y col. (2008) (21) se describió que el cerebelo desempeña un papel importante en la percepción sensorial y el control motor. Contiene más del 50% de todas las neuronas en el cerebro, aunque representa sólo el 10% del volumen total del cerebro. El aumento de los niveles de dopamina en esta región podría acelerar las habilidades motoras y el movimiento, como se evidenció en el presente estudio en la inducción de estrés por desorientación motora, aunque no se midieron los niveles de dopamina, forma parte de la fisiopatología (50).

En el estudio de Mandalari y col. 2011, se empleó la técnica de lesión a la medula espinal, y se administró la piel de almendra (30 mg/kg) después de 1h y 6h de la lesión, y se reportó que el tratamiento con la piel de almendra redujo significativamente la alteración histológica (presencia de edema) (66), esto se podría deber a los componentes de la piel de almendras, que es rica en flavonoides, principalmente catequinas, epicatequinas, kaempferol, isoramnetina.

Según una revisión de Williams y col. 2012, los flavonoides, metabolitos secundarios de las plantas aumentan la expresión de las proteínas neuroprotectoras y neuromoduladoras, además de aumentar las conexiones neuronales; también podrían conducir a mejorar el rendimiento cognitivo a través de un aumento del flujo sanguíneo cerebral y a la capacidad de iniciar la neurogénesis en el hipocampo, además tienen un potencial para inhibir la apoptosis neuronal provocada por especies neurotóxicas (por ejemplo, el estrés oxidativo y la neuroinflamación) (67).

En el estudio de Selvaraju y col. 2014, se empleó la vitamina E (tocoferoles y tocotrienoles) en la protección de los astrocitos frente a la lesión de glutamato, cuyos resultados evidencian que esta vitamina, tanto tocoferoles y tocotrienoles, puede dar mejores efectos neuroprotectores hacia las mitocondrias dañadas de los astrocitos y en la prevención de la lesión inducida por glutamato (68). Los tocotrienoles poseen una conformación especial en la membrana de bicapa de fosfolípidos debido a su cola lateral insaturada (69), que permite una mayor penetración eficiente en los tejidos con alto nivel de ácidos grasos insaturados, tales como el cerebro (68) y mantiene la homeostasis de las células neuronales del cerebro. En el presente estudio se usó la cápsula de Vitamina E (α -tocoferol), que como se explica tiene una menor penetración, lo que podría explicar los resultados histológicos del presente estudio, en que no hubo diferencia significativa del grupo III en comparación con el grupo II.

VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1 CONCLUSIONES

- La administración de la suspensión de la semilla de *Prunus dulcis* “almendra” a dosis de 500 mg/kg y 1000 mg/kg, produjo una disminución significativa de los niveles de lipoperoxidación (TBARs) en el tejido cerebral.
- La administración de la suspensión de la semilla de *Prunus dulcis* “almendra” a dosis de 100 mg/kg y 500 mg/kg, produjo un aumento significativo de los niveles de GS-NP en el tejido cerebral.
- La administración de la suspensión de la semilla de *Prunus dulcis* “almendra” logró disminuir levemente el daño histológico en el tejido nervioso (cerebro y cerebelo) a dosis de 100 y 500 mg/kg.
- De lo observado en el presente estudio de investigación se infiere que la administración de la suspensión de la semilla de *Prunus dulcis* “almendra” ejerce un efecto neuroprotector, en los indicadores bioquímicos (TBARs y GS-NP) sobre el tejido nervioso en ratones inducidos a estrés por desorientación motora.

6.2 RECOMENDACIONES

- Realizar pruebas de capacidad antioxidante *in vitro* de la semilla de *Prunus dulcis* “almendra”.
- Realizar la cuantificación enzimática de antioxidantes: Superóxido dismutasa, catalasa, y otras sustancias como: glutatión total, glutatión reducido y glutatión oxidado.
- Realizar la determinación bioquímica de TBARs y GS-NP a nivel de hipocampo y cerebelo.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Silva Roxana. Trastornos por estrés aquejan a 1,2 millones de peruanos. El Comercio. Junio 2014. Disponible en: <http://elcomercio.pe/lima/ciudad/trastornos-estres-aquejan-12-millones-peruanos-noticia-1734278>.
2. Koolhaas JM, Bartolomucci A, Buwalda B, de Boer SF, Flugge G, et al. Stress revisited: a critical evaluation of the stress concept. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. Volume 35, Issue 5, April 2011, Pages 1291–1301.
3. OMS. Centro de Prensa. Enfermedades no transmisibles. Nota descriptiva. Enero 2015.
4. Cueno Enrique. En el 2050 el mundo tendrá más adultos mayores que menores de 15 años. El Comercio. Octubre del 2012. Sección A18.
5. Instituto Nacional de Estadística e Informática (INEI). Perfil sociodemográfico de la tercera edad. Lima Perú: Instituto Nacional de Estadística e Informática; 1995.
6. Varela L, Chávez H, Gálvez M, Méndez F. Características del deterioro cognitivo en el adulto mayor hospitalizado a nivel nacional. *Revista de la Sociedad Peruana de Medicina Interna*. 2004; 17(2): 37-42.
7. Smeltzer SC, Bare BG, Brunner & Suddarth. Manual de Enfermería Médico Quirúrgico. Estrés y Adaptación 8ª Edición. México. Interamericana. 1998. V.1
8. Ticona Benavente, Paucar Quispe y Llerena Callata. Nivel de estrés y estrategias de afrontamiento en estudiantes de la facultad de enfermería – UNSA Arequipa. 2006. *Enfermería Global*. Junio 2010.
9. Lampe JW. Health effects of vegetables and fruit: assessing mechanisms of action in human experimental studies. *Am J Clin Nutr* 1999. 70: 475S–490S.
10. Poulouse Shibu M., Miller Marshall G., y Shukitt-Hale Barbara. Role of walnuts in maintaining brain health with age. *The Journal of Nutrition*. 2014. 561S - 566S.

- 11.Hong I-S, Lee H-Y, Kim H-P. Anti-Oxidative Effects of Rooibos Tea (*Aspalathus linearis*) on Immobilization-Induced Oxidative Stress in Rat Brain. PLoS ONE. 2014. Volume 9.
- 12.Halliwell B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? J Neurochem. 2006. 97:1634-1658.
- 13.Hu J, Luo CX, Chu WH, Shan YA, Qian ZM, et al. Hydroxyecdysone protects against oxidative stress-induced neuronal injury by scavenging free radicals and modulating NF-kappaB and JNK pathways. PLoS One. 2012. 7: e50764. doi: 10.1371/journal.pone.0050764.
- 14.Wong DL, Tai TC, Wong-Faull DC, Claycomb R, Kvetnansky R. Adrenergic responses to stress: transcriptional and post-transcriptional changes. Ann N Y Acad Sci. 2008. 1148: 249–256.
- 15.Hyeong-Geug Kim, Jin-Seok Lee, Min-Kyung Choi, Jong-Min Han, Chang-Gue Son. Ethanollic Extract of Astragali Radix and Salviae Radix Prohibits Oxidative Brain Injury by Psycho-Emotional Stress in Whisker Removal Rat Model. PLOS One. May 2014. Volume 9. Issue 5.
- 16.Ann N Y Acad Sci. Colaianna M, Schiavone S, Zotti M, Tucci P, Morgese MG, et al. Neuroendocrine profile in a rat model of psychosocial stress: relation to oxidative stress. Antioxid Redox Signal. 2013.
- 17.McCord JM. Evolution of Free Radicals and Oxidative Stress. The American Journal of Medicine. 2000; 108 (8): 652-659.
- 18.Gonzales Burgos, Elena. Estudio de la actividad neuroprotectora de diterpenos aislados del genero *sideretis* [Tesis doctoral]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Farmacia, Departamento de Farmacología. 2013.
- 19.Barnham, K.J., Masters, CL, Bush AI. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. Nat Rev. Drug Discov. 3, 2004. 205-214.
- 20.Mayne ST. Antioxidant nutrients and chronic disease: use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research. The Journal of Nutrition. 2003; 133 Suppl.
- 21.Poli Giuseppe, Cadenas Enrique, Packer Lester. Marcel Dekker. Free Radicals in Brain Pathophysiology. Inc. New York USA. 555 pags. 2000.
- 22.McEligot AJ, Yang S, Meyskens FL. Redox regulation by intrinsic species

- and extrinsic nutrients in normal and cancer cells. *Annu Rev Nutr.* 2005. 25: 261-295.
23. Dringen R, Gutterer JM, Hirrlinger J. Glutathione metabolism in brain metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species. *Eur J Biochem* 2000. 267: 4912–4916.
24. Dringen R. Metabolism and functions of glutathione in brain. *Prog Neurobiol.* 2000. 62: 649–671.
25. Wang Lei, Muxin Gong, Nishida Hiroshi, Shirakawa Chieko, Sato Shinji y Konishi Tetsuya. Psychological Stress-Induced Oxidative Stress as a Model of Sub Healthy Condition and the Effect of TCM. *Evid Based Complemento Alternat Med.* 2007; 4 (2): 195-202.
26. Talwar SK, Xu S, Hawley ES, Weiss Sa, Moxon KA, Chapin JK. Rat navigation guided by remote control. *Nature* 2002; 417:37–8.
27. Chen Chung-Yen, Lapsley Karen, Blumberg Jeffrey. A nutrition and health perspective on almonds. *J Sci Food Agric.* 2006. 86:2245
28. Milbury PE, Chen C, G Dolinkowski, J. Blumberg. Determination of flavonoids and phenolics and their distribution in almonds. *J. Agric. Food Chem.* 2006, 54,5027-5023.
29. Hernández SA. Aceite de almendras dulces: extracción, caracterización y aplicación. *Quim. Nova*, Vol. 32, No. 5, 1342-1345, 2009.
30. USDA, Agricultural Research Service. USDA National nutrient database for standard reference, release 24. Nutrient Data Laboratory Home Page. Info almendra.2014.
31. Richardson, DP, A. Astrup, A. Cocaul, P. Ellis. The nutritional and health benefits of almonds: a healthy food choice. *Food Sci. Tecnología. Bull.: Func. Alimentos* 6 (4). 2009 1.10
32. Phillips KM, Ruggio DM, Ashraf-Khorassani M. Phytosterol composition of nuts and seeds commonly consumed in the United States. *J Agric Food Chem.* 2005; 53:9436-9445.
33. Chen Oliver and Blumberg Jeffrey. Phytochemical composition of nuts. *Asia Pac J Clin Nutr* 2008;17 (S1):329-332
34. Portalantioxidante.com. CORFO-Chile. Instituto de Nutrición y Tecnología de los alimentos (INTA). Base de datos de actividad

- antioxidante (ORAC) y de contenido de polifenoles totales (PFT) en frutas. Enero 2015.
- 35.Essa Musthafa, Vijayan Reshmi . Neuroprotective Effect of Natural Products Against Alzheimer's Disease. Neurochem Res. 22 May 2012. DOI 10.1007/s11064-012-0799-9.
- 36.Pribis Peter, Shukitt Bárbara. Cognition: the new frontier for nuts and berries. Am J Clin Nutr 2014;100 (suppl):347S–52S.
- 37.Blue diamonds almonds. Almond Production. Disponible en: <http://www.bluediamond.com/index.cfm?navid=386>
- 38.Martí Manuel. La Almendra. Unión Vegetariana Argentina. El Vegetariano Vegano N° 26. 2013. Disponible en: <http://uva.org.ar/index.php/la-almendra/>
- 39.Almond board of California. Processing Safe Product. Allergen Control. Disponible en: <http://www.almonds.com/processors/processing-safe-product#allergen-control>
- 40.Allergens & Safety - Almond Board Australia. Disponible en: http://www.australianalmonds.com.au/health/allergens_safety
- 41.Argimón Josep, Jiménez Josep. Métodos de investigación y epidemiología. 2004. Tercera edición. Elsevier.
- 42.Neuroprotección, Excitotoxicidad, El estrés oxidativo, Otros tratamientos neuroprotectores. Disponible en: http://centrodeartigo.com/articulos-enciclopedicos/article_81640.html
- 43.Shoemaker. Tratado de Medicina Crítica y Terapia Intensiva. 4ta Edición Editorial Panamericana. 2002, pp 1855.
- 44.Buege J. Aust S. Microsomal lipid peroxidation. Methods Enzymology 1978; 52; 302-306.
- 45.Suarez S. Detoxificación hepática y defensa antioxidante por efecto de xenobióticos alimentarios. Tesis de Maestría en Bioquímica. Facultad de Medicina, UNMSM. Lima, Perú.1995.
- 46.Analytical Methods for Resolving Data From TBA₂-MDA Reaction Mixtures. Disponible en: <https://www.nwlifescience.com/products/assaykit/tba-mdanalysis.htm>
- 47.CYTED/CNP. Metodos de avaliação da atividade farmacológica de

- plantas medicinais. 2° ed. Rio de Janeiro: CYTED/CNP; 2001.
48. Ley Peruana Nro. 27265 de la protección a los animales domésticos y a los animales silvestres mantenidos en cautiverio. 2010 March 2 [fecha de acceso 1 de abril de 2010]; disponible en: <http://www.congreso.gob.pe/ntley/Imagenes/Leyes/27265.pdf>
49. Guía de manejo y Cuidado de animales de Laboratorio: ratón. Ministerio de Salud. Centro Nacional de Productos Biológicos. INS. Lima 2008.
50. Mamunur Rahman, Takashi Ichiyanagi, Tadazumi Komiyama, Shinji Sato, and Tetsuya Konishi. Effects of Anthocyanins on Psychological Stress-Induced Oxidative Stress and Neurotransmitter Status. *Journal of Agricultural and food chemistry*. 2008, 56, 7545–7550.
51. Jenkins, David. Kendall, Cyril. Marchie, Augustine. Almonds Reduce Biomarkers of Lipid Peroxidation in Older Hyperlipidemic Subjects. *Journal of Nutrition*. 2008. 908-913.
52. Chen CY, Milbury PE, Lapsley K, Blumberg JB. Flavonoids from almond skins are bioavailable and act synergistically with vitamins C and E to enhance hamster and human LDL resistance to oxidation. *J Nutr*. 2005;135:1366–73.
53. Hyson DA, Schneeman BO, Davis PA. Almonds and almond oil have similar effects on plasma lipids and LDL oxidation in healthy men and women. *J Nutr*. 2002;132:703–7.
54. Talave´ra, S.; Felgines, C.; Texier, O.; Besson, C.; Gil-Izquierdo, A. Anthocyanin metabolism in rats and their distribution to digestive area, kidney, and brain. *J. Agric. Food Chem*. 2005, 53, 3902–3908.
55. La Fata Giorgio, Weber Peter and M. Hasan Mohajeri. Effects of Vitamin E on Cognitive Performance during Ageing and in Alzheimer’s Disease. *Nutrients* 2014, 6, 5453-5472
56. Zingg, J.M. Modulation of signal transduction by vitamin E. *Mol. Aspects Med*. 2007, 28, 481–506.
57. Celikbilek A, Gocmen AY, Tanik N, Yaras N, Yargicoglu P, Gumuslu S. Serum lipid peroxidation markers are correlated with those in brain samples in different stress models. *Acta Neuropsychiatrica* 2014.
58. Tablas de Composición de Alimentos. Moreiras y col., 2013.

(ALMENDRA SIN CÁSCARA).

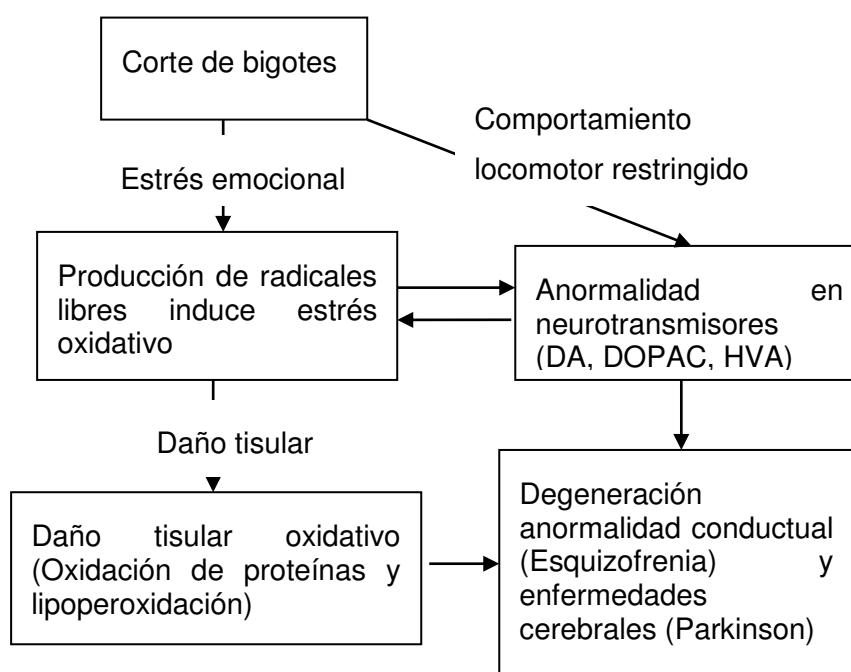
59. Rayman MP. Importancia del selenio para la salud humana. *The Lancet* 356. 2000, 233-241.
60. Chen J, Berry MJ. Selenium and selenoproteins in the brain and brain diseases. *J Neurochem.* 2003 Jul;86(1):1-12.
61. Ferri Paola, Angelino Donato, Gennari Lorenzo, Benedetti Serena. Enhancement of flavonoid ability to cross the blood–brain barrier of rats by co-administration with α -tocopherol. *The Royal Society of Chemistry* 2014.
62. Martínez-Flórez. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr. Hosp.* (2002) XVII (6) 271-278.
63. Frank, J.; Chin, X.W.D.; Schrader, C.; Eckert, G.P.; Rimbach, G. Do tocotrienols have potential as neuroprotective dietary factors? *Ageing Res. Rev.* 2012, 11, 163–180.
64. Serbinova, E.; Kagan, V.; Han, D.; Packer, L. Free radical recycling and intramembrane mobility in the antioxidant properties of alpha-tocopherol and alpha-tocotrienol. *Free Radic. Biol. Med.* 1991, 10, 263–275.
65. Halliwell B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem* 2006. 97 (6) 1634-58.
66. Mandalari G, Genovese T, Bisignano C. Neuroprotective effects of almond skins in experimental spinal cord injury. *Clinical Nutrition* 30. 2011. 221- 233.
67. Williams Robert J., Spencer Jeremy P.E. Flavonoids, cognition, and dementia: Actions, mechanisms, and potential therapeutic utility for Alzheimer disease. *Free Radical Biology & Medicine* 52 (2012) 35–45.
68. Thilaga Rati, Huzwah Khaza'ai1, Sharmili Vidyadaran. The neuroprotective effects of tocotrienol rich fraction and alpha tocopherol against glutamate injury in astrocytes. *Bosn J Basic Med Sci.* 2014;14(4):195-204.
69. Sen CK, Rink C, Khanna S. Palm oil-derived natural Vitamin E alpha-tocotrienol in brain health and disease. *J Am Coll Nutr.* 2010;29(3 Suppl):314S-23S.

ANEXOS

Anexo 1

Esquema: Estrés oxidativo inducido por estrés psicológico. Adaptado de Effects of Anthocyanins on Psychological Stress-Induced Oxidative Stress and Neurotransmitter Status. Tetsuya Konishi. Et al.

(50)



Anexo 2

Valor nutricional de la almendra (30)

Nutrient	Unit	1Value per 100 g	1 oz (23 whole kernels) = 28.35g	1 almond = 1.2g
Proximates				
Water	g	4.41	1.25	0.05
Energy	kcal	579	164	7
Protein	g	21.15	6	0.25
Total lipid (fat)	g	49.93	14.16	0.6
Carbohydrate, by difference	g	21.55	6.11	0.26
Fiber, total dietary	g	12.5	3.5	0.2
Sugars, total	g	4.35	1.23	0.05
Minerals				
Calcium, Ca	mg	269	76	3
Iron, Fe	mg	3.71	1.05	0.04
Magnesium, Mg	mg	270	77	3
Phosphorus, P	mg	481	136	6
Potassium, K	mg	733	208	9
Sodium, Na	mg	1	0	0
Zinc, Zn	mg	3.12	0.88	0.04
Vitamins				
Vitamin C, total ascorbic acid	mg	0	0	0
Thiamin	mg	0.205	0.058	0.002
Riboflavin	mg	1.138	0.323	0.014
Niacin	mg	3.618	1.026	0.043
Vitamin B-6	mg	0.137	0.039	0.002
Folate, DFE	µg	44	12	1
Vitamin B-12	µg	0	0	0
Vitamin A, RAE	µg	0	0	0
Vitamin A, IU	IU	2	1	0
Vitamin E (alpha-tocopherol)	mg	25.63	7.27	0.31
Vitamin D (D2 + D3)	µg	0	0	0
Vitamin D	IU	0	0	0
Vitamin K (phylloquinone)	µg	0	0	0
Lipids				
Fatty acids, total saturated	g	3.802	1.078	0.046

Fatty acids, total monounsaturated	g	31.551	8.945	0.379
Fatty acids, total polyunsaturated	g	12.329	3.495	0.148
Cholesterol	mg	0	0	0
Other				
Caffeine	mg	0	0	0

Footnotes

(b)"Other phytosterols = 58 mg/100g; these include 21 mg 4 mg delta 5-avenasterol sitostanol 2 mg campestanol

(a)"Unroasted"

Anexo 3

Aporte de flavonoides en 100 gramos de *Prunis Dulcis* “almendra” (30)

Flavonoids		
Anthocyanidins		
Cyanidin	mg	2.4
Flavan-3-ols		
(+)-Catechin	mg	1.3
(-)-Epigallocatechin	mg	2.6
(-)-Epicatechin	mg	0.6
Flavanones		
Eriodictyol	mg	0.2
Naringenin	mg	0.4
Flavonols		
Isorhamnetin	mg	2.6
Kaempferol	mg	0.4
Quercetin	mg	0.4
Proanthocyanidin		
Proanthocyanidin monomers	mg	7.8
Proanthocyanidin dimers	mg	9.5
Proanthocyanidin trimers	mg	8.8
Proanthocyanidin 4-6mers	mg	40
Proanthocyanidin 7-10mers	mg	37.7
Proanthocyanidin polymers (>10mers)	mg	80.3

Anexo 4

Clasificación taxonómica: Almendro (30)

Reino: *Plantae*

División: *Magnoliophyta*

Clase: *Magnoliopsida*

Orden: *Rosales*

Familia: *Rosacea*

Género: *Prunus*

Subgenero: *Amydalus*

Especie: *P. dulcis*

Nombre binomial: *Prunus dulcis*